

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL
GRUPO DE PESQUISA EM NANONEUROBIOFÍSICA - GNN

JÉSSICA SANTANA ASSUMPCÃO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DO RECONHECIMENTO DE MicroRNAs EXPRESSOS EM
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO (CECP)
UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**Sorocaba
2019**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL
GRUPO DE PESQUISA EM NANONEUROBIOFÍSICA - GNN

JÉSSICA SANTANA ASSUMPCÃO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DO RECONHECIMENTO DE MicroRNAs EXPRESSOS EM
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO (CECP)
UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação:

Prof^o Dr. Fabio de Lima Leite

Co-orientação:

Dr. Matias Eliseo Melendez

Dr. Giovanni Pimenta Mambrini

**Sorocaba
2019**

OLIVEIRA, Jéssica Santana Assumpção de

Estudo do reconhecimento de microRNAs expressos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP) utilizando nanopartículas de prata. / Jéssica Santana Assumpção de Oliveira. Sorocaba, 2019.

136f.

Dissertação de mestrado do curso do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – UFSCar, *Campus* Sorocaba, 2019.

Orientador (a): Prof. Dr. Fabio de Lima Leite.

Banca examinadora: Fabio Camargo Abdalla, Daiana Kotra Deda Nogueira

Bibliografia

1. Nanopartículas de prata. 2. Biomarcador molecular. 3. MicroRNAs. 4. CECP. I. Fabio de Lima Leite. II. Sorocaba – Universidade Federal de São Carlos. III. Estudo do reconhecimento de microRNAs expressos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP) utilizando nanopartículas de prata.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jéssica Santana Assumpção de Oliveira, realizada em 26/02/2019:

Prof. Dr. Fábio de Lima Leite
UFSCar

Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla
UFSCar

Profa. Dra. Daiana Kotra Deda Nogueira
UNIFESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, principalmente à minha mãe, que é um grande exemplo de mãe, de mulher, de guerreira, sempre compartilhando a sua coragem e perseverança à todos que estão ao seu redor. Dedico à ela, por todo apoio, tanto financeiramente quanto emocional, pelo incentivo e pela força que me deu para continuar, me mostrando que nunca estive sozinha nessa longa caminhada. Dedico também ao meu noivo, por estar sempre ao meu lado, pela paciência e pelo conforto que me traz nos momentos mais conturbados. Dedico à todos os educadores que fizeram parte da minha trajetória, desde o nível básico até o nível superior, pela contribuição que me ofereceram tanto para minha formação pessoal quanto para a minha formação profissional, fornecendo bases fundamentais para o meu crescimento como ser humano. Dedico à todas as pessoas, amigos e aquelas que de alguma forma compartilharam o seu conhecimento, para que hoje eu possa ser essa pessoa em quem me transformei. E, por fim, dedico este trabalho aos pacientes com neoplasias malignas, por ser o estímulo que nos leva a querer buscar por algo que traga um pouco mais de dignidade, conforto e qualidade de vida ao próximo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais: Adriana e Adilson, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida me apoiando e, me dando suporte para a conquista dos meus objetivos.

Agradeço ao meu noivo: Filipe, pela paciência, pela dedicação, amor e compreensão em todos os momentos, sendo esses fáceis ou difíceis de serem enfrentados. Por me ajudar sempre e me ensinar a cada dia ser uma pessoa melhor.

Agradeço a todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para eu ser essa pessoa que me transformei.

Agradeço à todos os docentes que contribuíram muito para a minha formação tanto profissional quanto na formação como ser humano. Agradeço em especial ao meu orientador e amigo Fabio, primeiramente pela oportunidade e, por confiar em meu potencial, me apoiando sempre. E, ao meu co-orientador Giovanni, pelo apoio e o compartilhamento de seu conhecimento sobre nanopartículas de prata. O apoio e o conhecimento de ambos foram muito importantes na concretização desse trabalho.

Agradeço à toda família GNN, à cada um: Ari, Akemi, Pam, Jé, Adriano, Lívia, Amanda, Mari e Brunas pela amizade, companheirismo e, por compartilhar todo o conhecimento de vocês para que eu possa crescer mais um pouco como pessoa e profissional. Agradeço em especial a Akemi, por me “aguentar” ao longo desses dois anos, por ser paciente, me auxiliando em todas as etapas desse trabalho e, antes que eu me esqueça, obrigada por me aceitar no time de nanopartículas. O seu amor pela ciência é contagiante!

Agradeço à banca examinadora por aceitar o convite e, principalmente por compartilhar o seu conhecimento tornando o trabalho enriquecedor.

Agradeço ao Hospital de Câncer de Barretos, pela parceria, em especial ao meu co-orientador Matias à todo apoio, suporte e incentivo para a realização desse trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba e, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental pela oportunidade de estudo e pesquisa, pois a minha formação não é só fruto dos professores, mas também dessa universidade e desse programa.

Agradeço à CAPES pelo fomento no projeto que contribuiu para a realização desse trabalho.

“Enquanto há vida, há esperança”.
Eclesiastes 9:4.

RESUMO

Oliveira, Jéssica Santana Assumpção de. *Estudo do reconhecimento de microRNAs expressos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP) utilizando nanopartículas de prata*. 2019. 136f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2019.

O Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP) é um tipo de tumor maligno que apresenta uma característica heterogênea, uma vez que acomete diferentes sítios anatômicos como, por exemplo, a cavidade oral, a laringe e a faringe. O principal problema associado a esta neoplasia refere-se ao elevado número de mortes decorrentes dos atrasos nos diagnósticos. A escassez de recursos da saúde pública, os altos custos para a realização de exames de detecção de tumor, os atuais métodos de diagnósticos tardios e demais aspectos contribuem para que as células malignas disseminem aos tecidos adjacentes, diminuindo a expectativa e qualidade de vida dos pacientes. Com a necessidade em auxiliar e aprimorar os estudos médicos atuais, a utilização de nanopartículas na medicina, tem se tornado um aspecto bastante interessante, no que se refere à criação de produtos e novas técnicas a fim de melhorar a saúde. Isso é possível porque essas nanopartículas apresentam um alto potencial em estudos de monitoramento, diagnóstico e tratamento de doenças em estágios iniciais. Esse trabalho tem por finalidade estudar as nanopartículas de prata (AgNPs) no reconhecimento de microRNAs específicos para o CEPC, com o objetivo de analisar a sua atividade como nanobiossensor, visto que suas propriedades fotoquímicas são únicas e eficientes para a utilização como sondas fluorescentes. Para isso, serão utilizados os marcadores tumorais metastáticos miR-203 e miR-205. A metodologia consistiu em imobilizar oligonucleotídeos na superfície de AgNPs e, em seguida submetê-los ao contato com os alvos miR-203 e miR-205. Resultados obtidos demonstraram que somente o protocolo 3 foi eficiente na imobilização dos oligo-miRs e, que a interação entre o complexo formado pelas AgNPs modificadas e os microRNAs promoveu uma mudança de coloração na suspensão coloidal, indicando o anelamento específico formado entre a extremidade livre do oligo-miR e seus respectivos microRNAs. Tais resultados foram comprovados pelas técnicas UV-Vis, FTIR e AFM. O caráter inovador do projeto está no fato de que essa interação específica alcançada poderá contribuir com métodos de diagnósticos diferenciados devido à alta sensibilidade do material em reconhecer pequenas concentrações dos alvos estudados, que podem atuar como uma alternativa potente na detecção em estágios iniciais o CECP, melhorando então, as técnicas de diagnóstico existentes.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata. Biomarcador Molecular. Metástase. MicroRNAs. Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço.

ABSTRACT

Oliveira, Jéssica Santana Assumpção de. *Study of the recognition of microRNAs expressed in squamous cell carcinomas of the head and neck using silver nanoparticles*. 2019. 136f. Dissertation (Master in Biotechnology and Environmental Monitoring) – Center for Science and Technology for Sustainability, Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2019.

Epidermoid Carcinoma of the Head and Neck is a type of malignant tumor that presents a heterogenous characteristic, since it affects different anatomical sites like, for example, the oral cavity, larynx and pharynx. The main problem associated with this neoplasia is the high number of deaths due to delays in diagnosis. The scarcity of public health resources, the high costs of performing tumor detection tests, the current methods of late diagnosis and other aspects contribute to the malignant cells spreading to adjacent tissues, decreasing the patients' expectations and quality of life. With the need to assist and improve current medical studies, the use of nanoparticles in medicine has become a very interesting aspect in creating products and new techniques to improve health. This is possible because these nanoparticles have a high potential in studies of monitoring, diagnosis and treatment of diseases in the early stages. This work aims to study silver nanoparticles (AgNPs) in the recognition of specific microRNAs for CEPC, with the objective of analyzing their activity as nanobiosensor, since their photochemical properties are unique and efficient for use as fluorescent probes. For this, the metastatic tumor markers miR-203 and miR-205 will be used. The methodology consisted in immobilizing oligonucleotides on the surface of AgNPs and then subjecting them to contact with the miR-203 and miR-205 targets. Results showed that only protocol 3 was efficient in the immobilization of oligo-miRs and that the interaction between the complex formed by the modified AgNPs and the microRNAs promoted a colloidal suspension staining change, indicating the specific annealing formed between the free end of the oligo-miR and their respective microRNAs. These results were confirmed by UV-Vis, FTIR and AFM techniques. The innovative character of the project is the fact that this specific interaction can contribute to different diagnostic methods due to the high sensitivity of the material to recognize small concentrations of the studied targets, which can act as a potent alternative in the early detection of CEPC, thus improving the existing diagnostic techniques.

Keywords: Silver nanoparticles. Molecular biomarker. Metastasis. MicroRNAs. Epidermoid carcinoma of the head and neck.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do ciclo celular	22
Figura 2 - Ação de proto-oncogenes e genes supressores tumorais em condições normais e após eventos mutacionais	25
Figura 3 - Fases da Carcinogênese	28
Figura 4 - Características das células cancerosas	29
Figura 5 - Regiões acometidas pela neoplasia de cabeça e pescoço	32
Figura 6 - Biogênese dos microRNAs	41
Figura 7 - Comparação entre os nanomateriais e as biomoléculas	47
Figura 8 - Esquema representativo da oscilação plasmônica na superfície das nanopartículas metálicas em resposta à excitação da radiação eletromagnética	51
Figura 9 - Esquema representativo de um sensoriamento feito por nanopartículas de prata	51
Figura 10 - Rotas de síntese <i>Top-down</i> e <i>Bottom-up</i> para a obtenção de nanopartículas metálicas	53
Figura 11 - Esquema representativo dos mecanismos de estabilização de nanopartículas: (a) estabilização eletrostática que ocorre devido a adsorção de íons na superfície das nanopartículas, (b) estabilização eletrostática devido a adsorção de moléculas orgânicas e (c) estabilização estérica por meio de ligações covalentes	55
Figura 12 - Mecanismos de imobilização de biomoléculas. (A) Imobilização por adsorção eletrostática e (B) Imobilização por ligação covalente.	58
Figura 13 - Modificação Ditiol (DTPA)	60
Figura 14 - Esquema representativo do processo de síntese de nanopartículas de prata	62
Figura 15 - O esquema da redução da molécula de DTPA liberando dois grupamentos tióis para ancorar em superfícies metálicas	68
Figura 16 - Suspensão coloidal de AgNPs. (A) Síntese 1 em que foi utilizado 200 µL de hidróxido de amônio (8,4%). (B) Síntese 2 em que foi utilizado 1 mL de hidróxido de amônio (30%)	74
Figura 17 - Espectro de absorbância plasmônica no UV-Vis das AgNPs. (A) Síntese 1, (B) Síntese 2.....	75

Figura 18 - Imagem das AgNPs obtidas por AFM em uma área de varredura de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$. (A) e (C) representam a altura bidimensional das AgNPs, sendo (A) referente à síntese 1 e (C) à síntese 2. (B) e (D) representam a altura tridimensional das AgNPs, sendo (B) referente à síntese 1 e (D) à síntese 2	80
Figura 19 - Histograma de distribuição de tamanho de AgNPs esféricas da síntese 1 determinado a partir de uma imagem de AFM bidimensional de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$	81
Figura 20 - Histograma de distribuição de tamanho de AgNPs esféricas da síntese 2 determinado a partir de uma imagem de AFM bidimensional de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$	83
Figura 21 - Síntese de nanopartículas de prata pelo método do citrato com adição de hidróxido de amônio (8,4% - síntese 1) e (30% - síntese 2) sob condições ambiente	85
Figura 22 - Comparação da absorção plasmônica das AgNPs modificadas e não modificadas	88
Figura 23 - Imagem da amostra de AgNPs da síntese 1 obtidas por AFM. (1) imobilização do oligo-miR-203. (2) imobilização do oligo-miR-205. (A) imagem bidimensional em uma área de varredura de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ (1) e $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (2), (B) imagem bidimensional em uma área de varredura de $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$ (1) e $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ (2) e (C) imagem tridimensional da mesma amostra	91
Figura 24 - Imagem da amostra de AgNPs da síntese 2 obtidas por AFM. (1) imobilização do oligo-miR-203. (2) imobilização do oligo-miR-205 (A) imagem bidimensional em uma área de varredura de $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$, (B) imagem bidimensional em uma área de varredura de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ (1) e $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}^2$ (2) e (C) imagem tridimensional da mesma amostra	92
Figura 25 - Esquema representativo do processo de hibridização entre as AgNPs modificadas e o microRNAs	94
Figura 26 - Comparação da absorção plasmônica das AgNPs modificadas e não modificadas	96
Figura 27 - Espectro de FTIR das AgNPs (linha preta), AgNPs modificadas (linha vermelha) e interação com o miR-203 (linha verde)	99
Figura 28 - Espectro de FTIR das AgNPs (linha preta), AgNPs modificadas (linha vermelha) e interação com o miR-205 (linha verde)	100
Figura 29 - Comparação da temperatura de aquecimento ideal determinada para cada microRNA estudado.....	102
Figura 30 - Comparação do tempo de aquecimento ideal determinado para cada microRNA estudado.....	103
Figura 31 - Espectro de absorbância no UV-VIS das AgNPs (linha preta), AgNPs modificadas (linha vermelha), interação com o microRNAs sem aquecimento (linha azul). A linha verde refere-se aos microRNAs adicionados com o aquecimento para a interação. Em (A) espectro referente ao sistema do miR-203 e (B) o sistema referente ao miR-205	104

Figura 32 - Imagens das AgNPs. (A) e (D) AgNPs; (B) AgNPs modificadas com oligo-miR-203; (C) Interação com o miR-203, (E) AgNPs modificadas com oligo-miR-205 e (F) Interação com o miR-205105

Figura 33 - Espectro de absorvância das AgNPs no UV-Vis. Linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas; linha azul - Controle positivo: miR sem aquecimento; linha verde - Controle positivo: miR aquecido. O controle negativo está representado pela linha rosa. (A) Sistema do miR-203 e (B) Sistema do miR-205107

Figura 34 - Espectro de absorvância das AgNPs no UV-Vis. Linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas; linha azul - Controle negativo: Água sem aquecimento; linha verde - Controle negativo: Água aquecida. (A) Sistema do miR-203 e (B) Sistema do miR-205108

Figura 35 - Espectro UV-VIS da quantificação do limite mínimo (A) e máximo (B) do miR-203 mediada por AgNPs e variação do comprimento de onda de absorção máximo das AgNPs em interação com o miR-203 em diferentes concentrações. Comprimento de onda da variação máxima da absorvância das AgNPs modificadas (C) em interação com miR-203 em diferentes concentrações na faixa de 0,001 à 100 nM. (D) em interação com miR-203 em diferentes concentrações na faixa de 10000 à 50000 nM110

Figura 36 - Espectro UV-VIS da quantificação do limite mínimo (A) e máximo (B) do miR-205 mediada por AgNPs e variação do comprimento de onda de absorção máximo das AgNPs em interação com o miR-205 em diferentes concentrações. Comprimento de onda da variação máxima da absorvância das AgNPs modificadas (C) em interação com miR-205 em diferentes concentrações na faixa de 0,001 à 100 nM. (D) em interação com miR-205 em diferentes concentrações na faixa de 10000 à 50000 nM111

Figura 37 - Espectro de absorvância plasmônica no uv-vis das AgNPs. **Síntese 1:** (A) AgNPs não modificadas - linha preta e AgNPs modificadas com oligo-miR-203 - linha verde; (B) AgNPs não modificadas - linha preta e AgNPs modificadas com oligo-miR-205 - linha vermelha. **Síntese 2:** (A) AgNPs não modificadas - linha preta e AgNPs modificadas com oligo-miR-203 - linha verde; (B) AgNPs não modificadas - linha preta e AgNPs modificadas com oligo-miR-205 - linha vermelha134

Figura 38 - Comparação entre a coloração das AgNPs antes da imobilização e após a imobilização proposta no protocolo 1. **Síntese 1:** (A) AgNPs, (B) imobilização do oligo-miR-203 e (C) imobilização do oligo-miR-205. **Síntese 2:** (D) AgNPs, (E) imobilização do oligo-miR-203 e (F) imobilização do oligo-miR-205135

Figura 39 - Diferença de cor das suspensões coloidais. **Síntese 1:** (A) AgNPs estáveis (B) AgNPs instáveis devido a modificação do pH. **Síntese 2:** (C) AgNPs estáveis (D) AgNPs instáveis devido a modificação do pH136

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 - Relação entre alguns agentes carcinogênicos e algumas ocupações para o desenvolvimento de CECP	35
Tabela 2 - Especificações das amostras de miRNAs e seus respectivos oligonucleotídeos fornecidas Empresa Integrated DNA Technologies (IDT)	61
Tabela 3 - Reagentes utilizados para a síntese de AgNPs	64
Tabela 4 - Parâmetros selecionados para a construção do protocolo de imobilização seguido de redução química do grupamento ditiol inserido no oligonucleotídeo	67
Tabela 5 - Temperatura para o aquecimento da suspensão coloidal com o conjugado AgNP-oligo-miRs contendo amostras de microRNAs durante o processo de hibridização	70
Tabela 6 - Correlação de tamanhos de AgNPs e comprimento de onda na análise por UV-Vis	75
Tabela 7 - Dados para determinar a concentração molar AgNPs esféricas usando espectros de UV- Vis. d é o diâmetro, λ é comprimento de onda e ϵ é o coeficiente de absorvidade molar das partículas	77
Gráfico 1 - Comparativo das taxas de sobrevivência de pacientes fumantes e não-fumantes portadores da neoplasia maligna de cabeça e pescoço	33
Gráfico 2 - Número de publicações que imobilizam DNA na superfície de AgNPs para a construção de biossensores	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFM - Atomic Force Microscopy (Microscopia de Força Atômica)
- AgNPs - Nanopartículas de Prata
- Ag⁰ - Átomos de prata
- Ag⁺ - Prata ionizada
- AgNO₃ - Nitrato de prata
- AuNPs - Nanopartículas de ouro
- CECP - Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
- CPOM - Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular
- DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
- DTPA - Dithiol Phosphoramidite
- FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier)
- h - Hora
- HPV - Human Papiloma Virus (Papiloma Vírus Humano)
- IDT - Integrated DNA Technologies
- MHC I - Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
- MHC II - Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
- MicroRNAs, miRNA ou miR - pequenas moléculas de RNA
- min – Minutos
- mmol - Milimolar
- mRNA - RNA mensageiro
- Na₃C₆H₅O₇ - Citrato de sódio
- RISC - RNA-Induced Silencing Complex (Complexo de Indução do Silenciamento do RNA)
- RNA - Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
- SH - grupamento tiol
- TCD8⁺ - Linfócitos T responsáveis pela ação citolítica durante a defesa do organismo à patógenos
- TCD4⁺ - Linfócitos T responsáveis por coordenar a defesa imunológica
- TCEP - Tris 2-carboxyethyl-phosphine hydroxichloride
- TM - Temperatura de Melting
- u.m.a - Unidade de massa atômica

UV - Ultraviolet (Ultravioleta)

°C - Grau *Celsius*

μL - microlitros

μM - micromolar

mL - mililitros

nm - nanometros

nM - nanomolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO	20
2.1 GERAIS.....	20
2.2 ESPECÍFICOS.....	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1 BIOLOGIA DA NEOPLASIA MALIGNA	21
3.1.1 O ciclo celular e a neoplasia maligna	21
3.1.2 Proto-oncogenes e supressores tumorais	24
3.2 AGENTES CARCINOGENÉTICOS.....	25
3.3 FASES DA CARCINOGENESE	27
3.4 SISTEMA IMUNOLÓGICO E AS NEOPLASIAS MALIGNAS	30
3.5 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO.....	31
3.5.1 O efeito do álcool e do tabaco no desenvolvimento da neoplasia de cabeça e pescoço	33
3.5.2 Outros fatores associados ao CECP	34
3.5.3 Campo de cancerização	35
3.5.4 Metástase cervical	36
3.6 DIAGNÓSTICO, ESTADIAMENTO E TRATAMENTO DE NEOPLASIAS.....	36
3.7 BIOMARCADORES MOLECULARES DE NEOPLASIAS	39
3.7.1 MicroRNAs	39
3.7.2 MicroRNAs e as neoplasias malignas	42
3.7.3 CECP e os microRNAs	43
3.7.3.1 MicroRNA 203	44
3.7.3.2 MicroRNA 205	45
3.7.3.3 MicroRNAs 203 e 205: Biomarcadores neoplásicos circulantes	45
3.8 NANOTECNOLOGIA.....	46
3.8.1 Nanomateriais aplicados em estudos biomédicos	48
3.8.2 Nanopartículas metálicas	49
3.8.2.1 Propriedades ópticas	50
3.8.2.2 Métodos de Síntese.....	52
3.8.3 Estabilidade das nanopartículas metálicas	54
3.8.4 Imobilização de biomoléculas	56

3.8.4.1 Imobilização de DNA	57
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	60
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1.1 Obtenção dos miRNAs 203 e 205 e seus respectivos oligonucleotídeos complementares	60
4.1.2 Síntese de nanopartículas de prata	61
4.1.3 Imobilização dos oligonucleotídeos complementares (Oligo-miRs) nas nanopartículas de prata	64
4.1.3.1 Tratamento 1: Imobilização espontânea entre os oligo-miRs tiolados e as AgNPs	65
4.1.3.2 Tratamento 2: O efeito do pH ácido na imobilização de oligo-miRs tiolados em nanopartículas de prata	65
4.1.3.3 Tratamento 3: Redução química da molécula de DTPA para ativação do grupamento ditiol.....	66
4.2 DETECÇÃO DOS MICRORNAS	68
4.2.1 Hibridização do complexo AgNPs-oligo-miR e o seu alvo específico.....	68
4.2.1.1 Condições fixas de tempo (10 min) e temperatura de reação (70°C)	68
4.2.2 Otimização dos parâmetros do sensor	69
4.2.2.1 Condições variadas de tempo e temperatura de reação	69
4.2.2.1.1 Investigação da temperatura de aquecimento	69
4.2.2.1.2 Investigação do tempo de aquecimento	70
4.3 CONTROLE NEGATIVO	70
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	71
4.4.1 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	71
4.4.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo reflectância total atenuada (ATR-FTIR).....	72
4.4.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).....	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	73
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	73
5.1.1 Síntese e propriedades das nanopartículas de prata	73
5.1.1.1 Formação de AgNPs	73
5.1.1.2 Determinação da concentração de AgNPs	76
5.1.1.3 Determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas	78
(a) Determinação da largura total à meia altura (FWHM) utilizando UV-Vis	78
(b) Microscopia da força atômica (AFM)	79

5.2 ESTABILIDADE DAS AgNPs	84
5.3 IMOBILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM OS OLIGO-miRs	86
5.3.1 Redução química da molécula de DTPA para ativação do grupamento ditiol (Tratamento 3)	86
5.3.1.1 Caracterização do conjugado AgNP-oligo-miR	90
5.4 SENSORIAMENTO DE microRNAs UTILIZANDO OS CONJUGADOS AgNPs-OLIGO-miR-203 e AgNPs-OLIGO-miR-205.....	93
5.4.1 Condições fixas de tempo (10 min) e temperatura de reação (70°C)	93
5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO SENSOR POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	97
5.6 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SENSOR	101
5.6.1 Condições variadas de tempo e temperatura de reação	101
5.6.2 Caracterização da otimização do sensor por espectroscopia UV-Vis	104
5.6.2.1 Controle negativo	106
5.7 SENSIBILIDADE DO SENSOR	108
5.7.1 Quantificação do limite mínimo e máximo de microRNAs durante o sensoriamento utilizando o conjugado AgNP-oligo-miRs	108
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
7 PERSPECTIVAS.....	113
8 REFERÊNCIAS.....	114
APÊNDICE A - IMOBILIZAÇÃO ESPONTÂNEA ENTRE OS OLIGO-miRs TIOLADOS E AS AgNPs (TRATAMENTO 1)	133
APÊNDICE B - O EFEITO DO PH NA IMOBILIZAÇÃO DOS OLIGO-miRs NA SUPERFÍCIE DAS AgNPs (TRATAMENTO 2)	135

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas atuais na saúde pública são as neoplasias malignas (BIANCONI *et al.*, 2013). Estas referem-se à um grupo de doenças caracterizadas por um crescimento celular desordenado proveniente de um descontrole no processo de divisão celular (AKAGI *et al.*, 2003).

Segundo estimativas, dos 14 milhões de novos casos da doença no mundo espera-se um aumento de cerca de 70% para os próximos 20 anos (WHO, 2017). Todavia, o principal problema atrelado à neoplasia maligna não está no aumento do número de casos novos, mas sim, refere-se ao elevado número de mortes decorrente dos atrasos nos diagnósticos (CARVALHO *et al.*, 2015).

O Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP) é um tipo de neoplasia maligna que possui uma característica bastante heterogênea, pois é responsável por acometer o epitélio de revestimento nos diferentes sítios anatômicos da região da cabeça e do pescoço como da cavidade oral (lábios, língua, palato duro, gengiva e assoalho da boca), da faringe (nasofaringe e orofaringe) e, por fim, da laringe (CARVALHO *et al.*, 2015; MA; MACHESKY, 2015; PEREIRA *et al.*, 2007; SANDOVAL, 2011).

A etiologia dessa doença está diretamente associada à carcinogênicos. O consumo de tabaco e álcool constitui-se o fator principal para o desenvolvimento da doença que atinge frequentemente homens entre 50 e 80 anos de vida (CARVALHO *et al.*, 2015; RAWAL *et al.*, 2015; SANDOVAL, 2011). Entretanto, outros fatores também podem influenciar nessa tumorigênese como: infecção viral (HPV), alimentação pobre em nutrientes, higienização bucal deficiente, entre outros (SANDOVAL, 2011; TALAMINI *et al.*, 2002).

A sobreposição dos sintomas aos de outras patologias, as longas e demoradas etapas procedimentais de detecção de tumores, os altos custos para o diagnóstico e a escassez de recursos nos sistemas públicos de saúde são aspectos que promovem o agravamento do CECP, diminuindo as chances de cura dos pacientes (CAPPELLESSO *et al.*, 2015; BHARGAVA *et al.*, 2016; TYSON *et al.*, 2016; SZABO *et al.*, 2017; SUHAG *et al.*, 2017).

Assim, a necessidade de uma investigação molecular da tumorigênese para o entendimento dos mecanismos e processos regulatórios da expressão gênica bem como a utilização de marcadores biológicos que indiquem a desordem metabólica e genética das

células causadas por esta patologia, tornou-se essencial para o aprimoramento e evolução dos estudos médicos atuais (ZHOU *et al.*, 2017).

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA que apresentam um papel importante no entendimento da biologia do câncer (KANWAL *et al.*, 2017; POGRIBNY, 2017). A participação na regulação de genes supressores tumorais e oncogenes, a ação em vias metastáticas e a expressão tecido/tumor específica dos microRNAs mostra a grande relevância dessas biomoléculas como promissores marcadores moleculares de neoplasias malignas em estudos de biomonitorização humana (WANG; CHEN; SEN, 2016; CHATTERJEE *et al.*, 2017).

A combinação dessas moléculas com as técnicas inovadoras de alta sensibilidade e especificidade proposta pela nanotecnologia pode ser uma excelente ferramenta para melhorar os métodos de diagnósticos e delinear tratamentos mais pontuais às neoplasias malignas (POWRÓZEK *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2017; TIAN *et al.*, 2017).

Diante disso, o uso de nanopartículas de prata pode contribuir para o desenvolvimento de nanobiossensores de marcadores moleculares específicos, uma vez que a exploração de suas características físico-químicas permite a aplicação no monitoramento e manipulação de sistemas biológicos em estudos médicos (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTI, 2014; CARLES; HERMOSILLA, 2008).

Este trabalho, portanto, propôs o desenvolvimento de um sensor baseado em AgNPs conjugadas com oligonucleotídeos para avaliar a aplicabilidade dessa nanoestrutura no reconhecimento de microRNAs específicos ao CECP. O objetivo foi desenvolver protocolos para cada etapa de construção do sensor, com a perspectiva de contribuir para uma detecção rápida que identifique as células malignas nos estágios iniciais da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Estudar o potencial de aplicação de nanopartículas de prata (AgNPs) como nanobiossensores no reconhecimento de células cancerosas, mais especificamente, no reconhecimento de microRNAs específicos de metástases linfonodais de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP).

2.2 ESPECÍFICOS

- i. Empregar o método de redução química para obtenção de AgNPs;
- ii. Promover a funcionalização de AgNPs com oligonucleotídeos complementares às sequências dos microRNAs miR-203 e miR-205;
- iii. Realizar a caracterização das AgNPs funcionalizadas a partir das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia de Força Atômica (AFM);
- iv. Analisar a eficiência da atividade do nanobiossensor de AgNPs no reconhecimento dos microRNAs miR-203 e miR-205 por espectrofotometria na região visível do espectro eletromagnético;
- v. Efetuar uma comparação a partir de um teste de contraprova com o marcador não específico, a fim de avaliar a especificidade do nanobiossensor aplicado.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BIOLOGIA DA NEOPLASIA MALIGNA

3.1.1 O ciclo celular e a neoplasia maligna

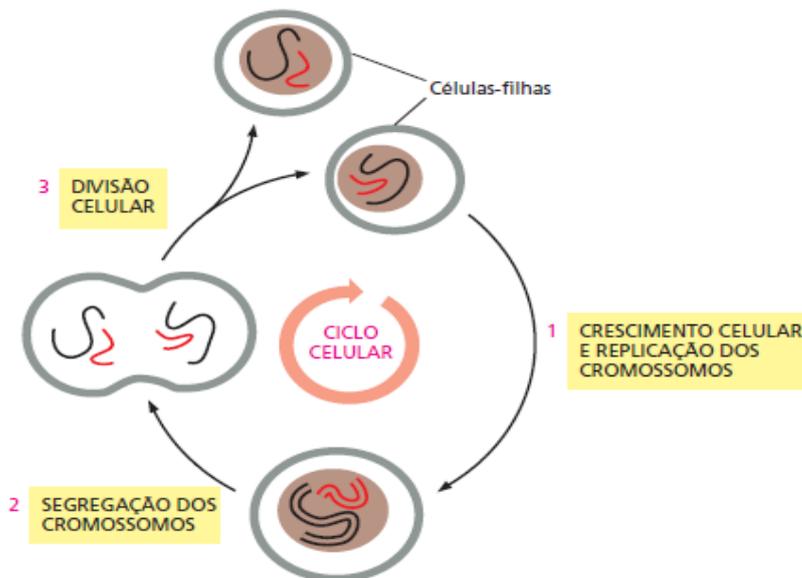
Todos os organismos são constituídos de células individuais responsáveis pela manutenção dos processos fisiológicos. Entender, portanto, o funcionamento da maquinaria celular, por exemplo, como são feitos os ajustes para manter constante e equilibrado o meio intra e extracelular em um organismo, é de suma importância para compreender e explicar a origem de algumas doenças (HUNT; NASMYTH; NOVÁK, 2011).

As células apresentam um ciclo coordenado de crescimento e de reprodução para assegurar a conservação de suas características essenciais. São responsáveis por armazenar informações genéticas e sintetizar proteínas que participam de reações que controlam seu tamanho, formato e comportamento (BARNUM; O'CONNEL, 2014).

A figura 1 mostra um esquema da reprodução das células por meio da divisão celular e duplicação de seu conteúdo. Além disso, mostra hipoteticamente que tal processo é responsável por originar duas células-filhas idênticas geneticamente. Esse processo pode continuar e cada célula idêntica originada dividir-se novamente gerando clones (ALBERTS *et al.*, 2011).

Sabe-se ainda que a regulação desses mecanismos de controle do ciclo celular é imprescindível para promover um equilíbrio citológico, histológico e funcional que mantém a vida, uma vez que este é um processo que envolve a cópia e transmissão do material genético para a próxima geração de células (VERMEULEN; VANBOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; LAI *et al.*, 2005).

Figura 1 - Esquema representativo do ciclo celular.



Fonte: ALBERTS *et al.*, 2011.

Diferentes moléculas podem atuar na promoção desse equilíbrio monitorando as células que nascem e aquelas que morrem e, além disso assegurando todas as necessidades orgânicas do organismo. Estas moléculas são denominadas de fatores estimulantes e/ou inibidores dos mecanismos de divisão e multiplicação celular (OUYANG, 2012; TIMP; FEINBERG; 2013).

Em um processo natural, esse sistema de controle monitorado por proteínas reguladoras garante que os eventos de replicação do DNA, crescimento e divisão celular ocorram de modo sequencial e, ainda asseguram que cada etapa seja finalizada antes de iniciar a próxima (WILLIAMS; STOEBER, 2012).

O ciclo celular então, é bastante complexo e qualquer defeito envolvendo esses fatores controladores podem ser desastrosos ou até mesmo fatais, visto que os atrasos ou a interrupção de qualquer um de seus processos pode afetar a reposição de tecidos e órgãos (VERMEULEN; VANBOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; LAI *et al.*, 2005).

Isso acontece porque a irregularidade celular proveniente de uma falha na regulação dos mecanismos interfere na propagação do DNA de uma célula para outra, promovendo uma desordem celular que permite que as células comecem a crescer e a

dividir-se descontroladamente de modo à proporcionar danos irreversíveis ao organismo (EVAN; VOUSDEN; 2001; FRANK; IWASA; NOWAK, 2003; WU *et al.*, 2016).

Um dos problemas frequentes proveniente da desregulação no crescimento e divisão celular é o aparecimento de neoplasias (BASERGA, 1965).

Neoplasia, também denominada de tumor, é um crescimento anormal, autônomo e progressivo de determinado tecido. Refere-se a um conjunto de doenças que acometem diferentes regiões do corpo humano devido a ação desordenada das células que não respondem aos sinais de interrupção do estímulo que provocou o crescimento celular (AKAGI *et al.*, 2003).

De acordo com a potencialidade em danificar o tecido, as neoplasias podem ser classificadas em benignas e malignas. A neoplasia benigna pode ser categorizada como uma massa tumoral localizada circunscrita por uma cápsula ou pela compressão de tecidos adjacentes (WEINBERG, 2007).

Já na neoplasia maligna, popularmente denominada de câncer, as células apresentam uma perda na capacidade de aderência, disseminando e crescendo em locais mais distantes (YOKOTA, 2000; WEINBERG, 2007; SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013). Isso ocorre pois as células neoplásicas, por motivos genéticos ou adquiridos, não controlam os mecanismos de proliferação, exibindo diferentes graus de diferenciação celular e até mesmo a perda da especificidade tecidual (TIMP; FEINBERG, 2013; MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015).

Tal fato é o que caracteriza a complexidade e heterogeneidade tecidual proveniente dos múltiplos tipos celulares em diferentes estágios proliferativos que compõem a massa tumoral maligna (HORNBERG *et al.*, 2006).

A neoplasia maligna, portanto, apresenta uma alta agressividade dos tumores, uma vez que as células não obedecem a ordem natural de crescimento, se expandindo além dos limites do tecido de origem (BROOKS *et al.*, 2010).

O surgimento de tal doença é resultante da divisão de uma única célula modificada que transfere a informação genética alterada para as células descendentes. O estabelecimento dessa modificação produz uma célula anormal que gera clones com a mesma aberração (EVAN; VOUSDEN, 2001).

Alguns genes estão envolvidos na formação de neoplasias malignas, são eles os oncogenes e supressores tumorais (LEE; MULLER, 2010).

3.1.2 Proto-oncogenes e supressores tumorais

Os genes responsáveis pelo desenvolvimento de tumores são aqueles envolvidos no controle do ciclo celular, no processo de reparação de danos genéticos e até mesmo aqueles que governam a apoptose (VICENTE-DUEÑAS *et al.*, 2013).

Em células normais, os proto-oncogenes são genes inativos que atuam de modo controlado permitindo a estimulação da divisão celular. Os danos na informação genética podem tornar esses genes ativos, transformando-os em oncogenes (Figura 2) (VICENTE-DUEÑAS *et al.*, 2013).

A atividade dos oncogenes impede o controle da divisão celular resultando na proliferação desordenada de células. As proteínas sintetizadas induzem as células ao erro permitindo que escapem dos mecanismos de controle, originando os processos de cancerização¹ (EVAN; VOUSDEN, 2001).

Os genes supressores de tumores desempenham a função controladora do ciclo celular participando do adiamento da divisão celular, do reparo de erros genéticos e determinação dos processos apoptóticos. Porém, a mutação nesses genes pode torná-los inativos, permitindo a proliferação descontrolada das células (Figura 2) (LEE; MULLER, 2010).

Desse modo, as altas taxas proliferativas dessas células promovem certa resistência aos mecanismos imunológicos e, estas por sua vez, conseguem escapar dos processos de defesa do organismo (BHATIA; KUMAR, 2014).

Um dos genes supressores tumorais mais estudados é o gene TP53 que codifica uma proteína (p53) capaz de suprimir a formação de neoplasias. Sua atividade consiste em impedir que as células que apresentam danos em seu DNA entrem no ciclo mitótico até que as informações genéticas modificadas sejam corrigidas (ROMAGOSA *et al.*, 2011).

Considerado o guardião do genoma, a deleção² ou mutação³ desse gene produz uma proteína disfuncional⁴ que confere vantagens na promoção da sobrevivência de células malignas (ROMAGOSA *et al.*, 2011).

¹ Cancerização é o processo de desenvolvimento de tumores malignos

² Termo genético usado para explicar as anomalias cromossômicas que ocorrem em determinados genes. Refere-se a perda total ou parcial de sequências nucleotídicas de um cromossomo.

³ Mudanças que ocorrem nas sequências nucleotídicas do DNA.

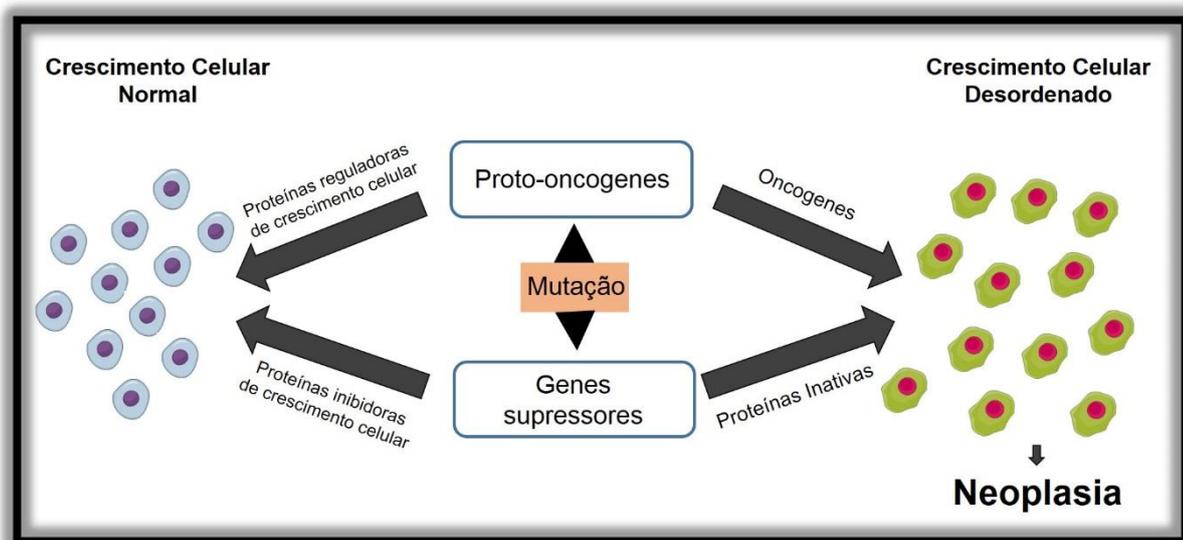
⁴ São proteínas que apresentam alterações em suas funções normais.

Estudos demonstram que tumores malignos com alterações no gene TP53 apresentam uma maior agressividade devido ao potencial invasivo e metastático das células anormais. Ainda, tais estudos demonstram que 70% das neoplasias apresentam esse gene mutante (MULLER; VOUSDEN, 2013).

Isso mostra que a instabilidade genômica e a decorrente dificuldade do sistema imunológico em combater tais células são fatores decisivos nos processos iniciais da carcinogênese (BHATIA; KUMAR, 2014).

Além do acúmulo de mutações genéticas e modificações epigenéticas⁵, o desenvolvimento de tumores está atrelado à ação de agentes carcinogênicos, mostrando que a neoplasia maligna é uma doença multicausal proveniente de um efeito simultâneo e sequencial de fatores genéticos e ambientais (MARTIN-PRESTON *et al.*, 1990; COGLIANO, 2011).

Figura 2 - Ação de proto-oncogenes e genes supressores tumorais em condições normais e após eventos mutacionais.



Fonte: DO AUTOR.

3.2 AGENTES CARCINOGENÉTICOS

Grande parte das neoplasias pode ter como agente iniciador uma variedade de fatores ambientais, muito dos quais podem ser evitados e prevenidos, tais como: o

⁵ Modificações que não alteram a sequência nucleotídica do DNA, porém promovem alterações na cromatina, na ação de RNAs não codificantes, entre outras.

tabagismo e o alcoolismo, por exemplo (MALHOTRA *et al.*, 2016; ALEXANDROV, 2016; CONNOR, 2017).

No cotidiano, uma exposição prolongada a tais fatores, denominados também de agentes carcinogênicos, pode contribuir para aumentar as taxas de incidência de um desenvolvimento tumoral, pois tais carcinógenos têm um grande potencial para a promoção de modificações genéticas nas células, fazendo-as ganhar novas capacidades e características, como já foi apresentado (SIDRANSKY, 2002).

Os carcinógenos podem ter uma ação sinérgica⁶ ou independente, mas na maior parte das neoplasias malignas sua contribuição para promover alterações no DNA está associada à um estresse oxidativo (MASO *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo resulta em um aumento de espécies reativas de oxigênio no espaço intracelular capazes de ocasionar a oxidação de proteínas sinalizadoras e alterar então, as vias de sinalização celular modificando a expressão gênica (RANI *et al.*, 2016).

Dentre as categorias que classificam os agentes carcinogênicos, a carcinogênese química tem as substâncias químicas (sintéticas ou naturais) como iniciadoras e promotoras da origem tumoral e, sua ação pode acontecer de forma direta ou indireta (“Fisiopatologia do Câncer – INCA”, [2018]; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Na carcinogênese química direta, as substâncias cancerígenas não necessitam de um processo de transformação, contudo, na indireta, estas requerem uma conversão metabólica no interior do organismo para provocar alterações celulares. Primeiramente, atuam provocando mutações celulares e, depois em uma segunda etapa, estimulam a multiplicação celular (“Fisiopatologia do Câncer – INCA”, [2018]; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Muitos desses agentes carcinogênicos químicos estão associados aos hábitos sociais, alimentares e ocupacionais como, por exemplo, o uso de cigarros, consumo de alimentos industrializados, utilização de medicamentos e à exposição a poluentes ambientais (BOREK; 1993; MASO *et al.*, 2016).

Diversos tipos da radiação eletromagnética como, por exemplo, a radiação ultravioleta é responsável pelo processo de carcinogênese física. Dois mecanismos estão intrincados nesse processo de indução do câncer: formações de lesões que provocam distorções no DNA e a imunossupressão (BOREK, 1993).

⁶ É um processo que envolve a cooperação de diferentes fatores para controlar o funcionamento do organismo.

No caso da carcinogênese biológica, inúmeros vírus de DNA e RNA agem como agentes causadores de muitas neoplasias em animais. Alguns deles, como é o caso do Papiloma Vírus Humano (HPV) e Epstein-Barr (EBV), possuem uma atenção maior, pois apresentam uma associação à gênese do câncer humano (CHATURVEDI *et al.*, 2008; CHAN *et al.*, 2017).

Além dos agentes carcinogênicos citados, outros produtos que fazem parte dos diferentes contextos em nosso cotidiano podem causar alterações celulares. São eles: os plásticos, detergentes, cosméticos, tintas, roupas, agrotóxicos (CLAPP; GENEVIEVE; MOLLY, 2007).

Isso mostra que, a neoplasia maligna pode ser considerada uma patologia ambiental e não somente relacionada a uma disfunção genética, uma vez que o surgimento de tumor também se associa à instabilidade do material genético diante das agressões impostas pelo ambiente, em que os efeitos cumulativos dos agentes carcinogênicos podem ser avaliados como iniciadores da carcinogênese (JEMAL *et al.*, 2014).

Todavia, é válido ressaltar que a biologia inata do indivíduo representa um importante papel nesse processo de origem e progressão tumoral, já que as características individuais são determinantes para o estabelecimento ou não de um dano celular (SIDRANSKY, 2002; JEMAL *et al.*, 2014).

3.3 FASES DA CARCINOGENESE

A carcinogênese é caracterizada como o processo de transformação das células normais em células neoplásicas que dão origem aos tumores malignos. É considerada um mecanismo bastante lento e pode demorar vários anos para que a célula anormal se torne maligna e origine uma neoplasia visível e detectável (LÓPES-OTÍN; MATRISIAN, 2007; INCA, “Fisiopatologia do Câncer”, Cap. 2, [2018]).

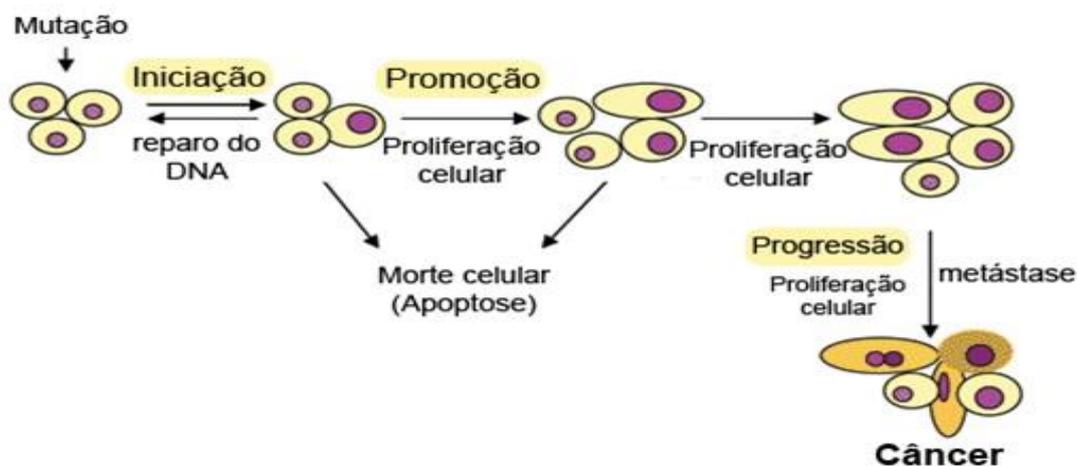
Este processo é dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão (Figura 3). Na iniciação, as células normais têm seus genes modificados devido a ação de carcinógenos, enquanto que na promoção a mutação do DNA torna-se permanente e agentes oncopromotores⁷ agem favorecendo a proliferação e inibindo a apoptose⁸ nas células anormais. Aqui, a modificação da expressão gênica potencializa a transformação celular (LÓPES-OTÍN; MATRISIAN, 2007).

⁷ Aqueles que promovem o desenvolvimento tumoral.

⁸ Processo de morte celular programada para eliminar células com defeitos ou infectadas.

O último estágio, a progressão, é caracterizada pelo crescimento descontrolado e irreversível das células mutantes, podendo apresentar eventuais metástases⁹ com grande potencial invasivo (LÓPES-OTÍN; MATRISIAN, 2007; CAPPELLESSO *et al.*, 2015).

Figura 3 - Fases da Carcinogênese.



Fonte: “Processo de carcinogênese”, 2013, [2018].

Ao tornarem-se invasivas, células cancerosas podem migrar diretamente de um tumor primário para regiões adjacentes e até mesmo se evadir para sítios mais distantes através de vasos sanguíneos ou linfáticos (CAPPELLESSO *et al.*, 2015).

Essa capacidade de evadir de um tecido primário e gerar metástase é um processo bastante complexo que depende tanto dos fatores presentes nessas células precursoras de tumor, como também dos sinais para invasão emitidos pelo microambiente onde se localiza o tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Assim, são eventos que envolvem além de alterações fenotípicas¹⁰, também alterações genéticas e epigenéticas nos mecanismos regulatórios de proliferação, motilidade e invasão (WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Hanahan e Weinberg (2000) mostraram que à medida em que as células normais evoluem para uma condição neoplásica adquirem características comportamentais que lhes conferem a capacidade de se tornarem tumorigênicas. Essas características produzem diferentes trajetórias de sinalizações devido às mudanças de expressão gênica e, como

⁹ Capacidade migratória de células por meio da corrente sanguínea ou sistema linfático.

¹⁰ Modificações nas características observáveis de um organismo.

resultado dessa anormalidade, apresentam comportamentos biológicos únicos que podem ser utilizados para compreender a diversidade das doenças neoplásicas (Figura 4).

Figura 4 - Características das células cancerosas.



Fonte: HANAHAN; WEINBERG, 2000 (Adaptado).

Em suma, a carcinogênese é iniciada quando um agente com propriedades mutagênicas promove modificações no DNA celular (HERCEG, 2007; BRAMBILLA; MARTELLI, 2009). A ausência de estímulos que promovam um reparo nas células danificadas pode resultar na ativação de oncogenes promotores de crescimento e inativação de genes supressores tumorais (LEE; MULLER, 2010). Assim há a promoção de uma multiplicação de células sem qualquer restrição e uma síntese de proteínas, respectivamente, que colaboram para um crescimento celular desordenado (LÓPEZ-OTÍN; MATRISIAN, 2007).

Concomitante a isso, a invasão e a metástase contribuem para a formação e progressão de neoplasias malignas (CHAFFER; WEINBERG, 2011). No entanto, a carcinogênese pode ser interrompida em qualquer estágio do desenvolvimento tumoral, desde que o organismo consiga fazer a repressão da proliferação celular por meio do sistema imunológico ou mecanismos genéticos reparando o dano provocado no genoma (INCA, “Fisiopatologia do Câncer”, Cap. 2, [2018]; DEVI, 2004).

3.4 SISTEMA IMUNOLÓGICO E AS NEOPLASIAS MALIGNAS

Como já citado, as neoplasias malignas são caracterizadas como uma patologia multifatorial¹¹ que confere às células a capacidade de transformação e imortalidade, além disso, tal modificação faz com que desenvolvam a habilidade de migrar para as mais diversas regiões do corpo afetando tecidos e órgãos (BROOKS *et al.*, 2010).

Todavia, o sistema imunológico busca promover a repressão dessas células por meio de mecanismos que produzam uma resposta de citotoxicidade¹² contra as células malignas até que estas entrem em um processo de morte celular programada (GILLIMORE; SIMON, 2008).

Em resumo, as proteínas sintetizadas pelas células anormais são processadas normalmente, porém estas apresentam um defeito em sua sequência de aminoácidos e, quando expostas na membrana plasmática da célula através das moléculas de MHC I, os linfócitos T CD8⁺ reconhecem a anormalidade e, ativam os eventos de citotoxicidade (CHEN *et al.*, 2007; EYERICH *et al.*, 2009)

O processo de degradação das células tumorais tem continuidade e, novamente os peptídeos da proteína são exibidos, porém agora pelas moléculas de MHC II, para a ativação dos linfócitos T CD4⁺. Estes são responsáveis pelos processos de fagocitose¹³ das células tumorais (BEACHY *et al.*, 2004).

A fagocitose, responsável por liberar citocinas, age ativando os linfócitos B e T específicos para o reconhecimento de antígenos neoplásicos e conseqüentemente, aumentar a eficiência da destruição das células induzindo-as à um processo de lise (SELINGER *et al.*, 2000; BEACHY *et al.*, 2004).

Grânulos citoplasmáticos contendo perforinas atuam na abertura de poros nas células neoplásicas e em seus clones para a entrada das granzimas. Estas últimas enzimas promovem a ativação de caspases desencadeando uma cascata de reações que induz as células à um suicídio celular (ABBAS *et al.*, 2000).

Contudo, mesmo com todos esses eventos apresentados, as células tumorais apresentam características que as tornam resistentes à resposta imunológica, conseguindo escapar do controle do sistema imunológico. Isso acontece devido à dificuldade de

¹¹ Diferentes fatores que contribuem para o desenvolvimento de neoplasias malignas.

¹² Processo de destruição de células com propriedades nocivas ao organismo.

¹³ Popularmente denominada de um processo digestivo de partículas sólidas por meio de células fagocíticas.

combater as altas taxas de proliferação celular dos tumores, o que permite a evasão de algumas células dos mecanismos de defesa do organismo (BHATIA; KUMAR, 2014).

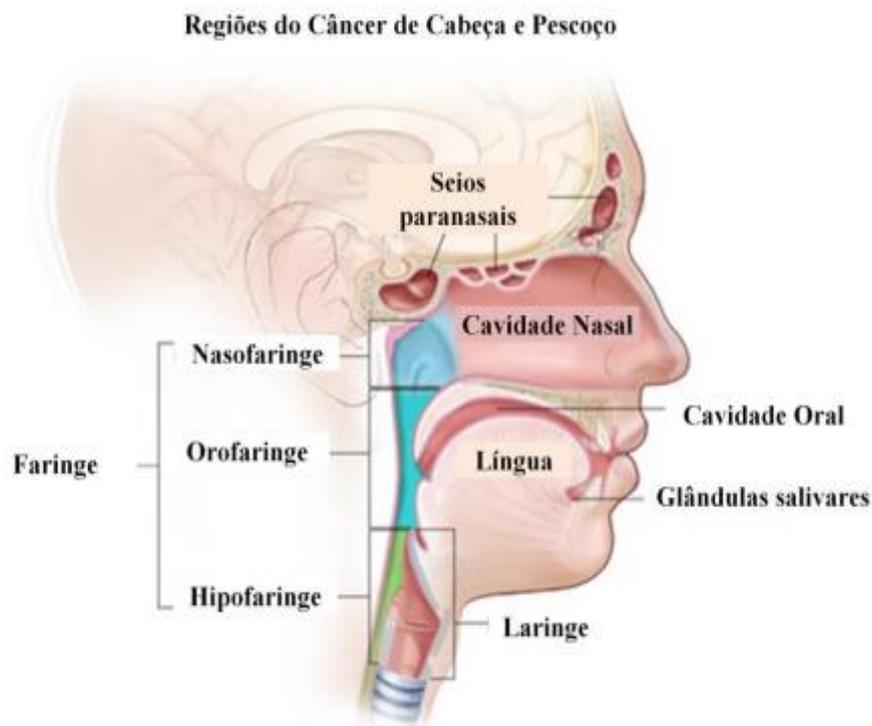
Estudos demonstram que as células tumorais apresentam uma diminuição das moléculas de MHC I e, isso pode estar associado ao fato dessas células escaparem da defesa imunológica. A redução das moléculas de MHC I reduz a quantidade de proteínas com defeito expostas na superfície celular, o que implica no reconhecimento feito linfócitos T CD8⁺, diminuindo a eficiência da destruição de células malignas (KAGESHITA *et al.*, 1999; HARMEY *et al.*, 2002; STEEG, 2006).

3.5 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO (CECP)

Entendido todo o processo de desenvolvimento tumoral e como as células neoplásicas conseguem mascarar as suas modificações genéticas para escapar do sistema imunológico, o trabalho em questão abordará de forma aprofundada um estudo sobre a neoplasia maligna de cabeça e pescoço.

O CECP, também denominado de câncer de cabeça e pescoço é uma neoplasia maligna que possui uma característica bastante heterogênea, pois é responsável por acometer o epitélio de revestimento como, por exemplo, superfícies mucosas e úmidas nos diferentes sítios anatômicos da região da cabeça e do pescoço incluindo (i) o epitélio da cavidade oral que compreende os lábios, a língua, o palato duro, a gengiva e o assoalho da boca; (ii) da faringe, compreendendo a nasofaringe e a orofaringe e (iii) da laringe (Figura 5) (CARVALHO *et al.*, 2015).

Figura 5 - Regiões acometidas pela neoplasia de cabeça e pescoço.



Fonte: “Head and Neck Cancers - National Cancer Institute”, [2018].

Além dessas diferentes regiões anatômicas acometidas por esse tipo de tumor, o CECP pode ter uma ação sobre as glândulas salivares, todavia essa é uma neoplasia bastante rara (PEREIRA *et al.*, 2007).

Estimativas apontam que o CECP é considerado o sexto tipo de câncer mais comum do mundo e, pode representar cerca de 5% de todos os tipos de neoplasias malignas existentes (PEREIRA *et al.*, 2007).

Segundo estudos atuais, aproximadamente 600 mil novos casos desse tipo de neoplasia maligna são computados por ano no mundo todo, sendo que desses valores quase 250 mil é o número de mortes anual no mundo (FERLAY *et al.*, 2010; MASOUDI, 2017).

A etiologia desta neoplasia maligna está associada à carcinogênicos. O consumo de tabaco e álcool constitui-se o fator principal para o desenvolvimento da doença, atingindo frequentemente duas vezes mais os homens entre 50 e 80 anos de vida do que as mulheres (SANDOVAL, 2011; CARVALHO *et al.*, 2015; RAWAL *et al.*, 2015).

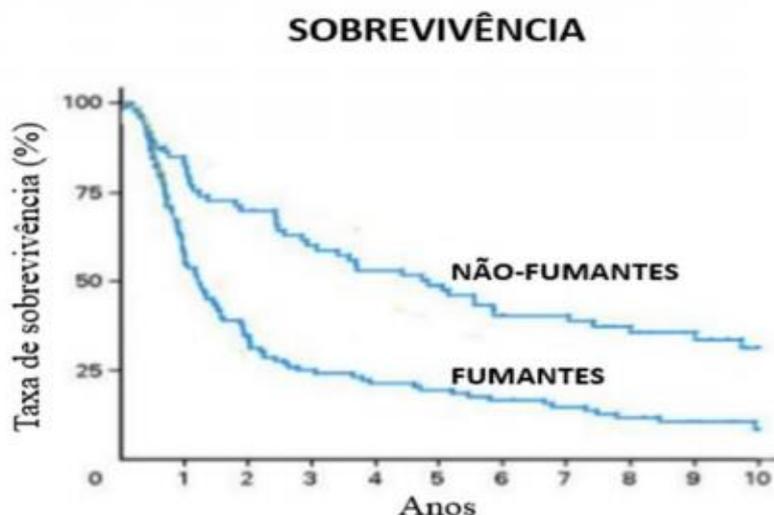
3.5.1 O efeito do álcool e do tabaco no desenvolvimento da neoplasia de cabeça e pescoço

O comportamento e o estilo de vida de pessoas são fatores determinantes na etiologia¹⁴ do CECP. O uso de tabaco é um dos principais fatores para o desenvolvimento desse tipo de tumor maligno, aproximadamente 85% dos casos dessa patologia estão associados ao tabagismo (DO-WALDEN; MD-AYGUN, 2012).

Pesquisas comprovam que a incidência da doença em fumantes pode apresentar um fator de risco de 5 a 25 vezes maior quando comparado aos indivíduos não fumantes (KRESTY *et al.*, 2002; TEPPPO *et al.*, 2003). Esse aumento é resultado dos efeitos genotóxicos¹⁵ dos carcinógenos inalados através da fumaça do tabaco (RAWAL *et al.*, 2015).

Além de apresentarem um alto risco do desenvolvimento do CECP, as pessoas acometidas por esse tipo de neoplasia e, que continuam fazendo o uso do tabaco apresentam uma redução da qualidade de vida e, em decorrência disso, uma diminuição na taxa de sobrevivência (Gráfico 1) (MAASLAND *et al.*, 2014).

Gráfico 1 - Comparativo das taxas de sobrevivência de pacientes fumantes e não-fumantes portadores da neoplasia maligna de cabeça e pescoço.



Fonte: JCO. June 10, 2012; 30(17): 2102-2111 (Adaptado).

¹⁴ Determinação das causas e origens de patologias.

¹⁵ O termo genotoxicidade está associado às características de agentes químicos, físicos ou biológicos com ação tóxica sobre o material genético.

O álcool também é um importante agente promotor da carcinogênese de cabeça e pescoço (CONNOR, 2017). Além do seu efeito independente nesse processo, o consumo de álcool pode atuar em sinergismo com o tabaco, ampliando os efeitos deste último e, favorecendo o desenvolvimento da neoplasia (MASO *et al.*, 2016). No entanto, a magnitude do efeito depende dos níveis de exposição a esses carcinógenos (MAASLAND *et al.*, 2014).

3.5.2 Outros fatores associados ao CECP

Além do tabagismo e alcoolismo, outros fatores também podem influenciar no desenvolvimento do CECP. Infecções virais, como aquelas associadas ao HPV (do inglês, *human papillomavirus*), estão contribuindo para um aumento na incidência de tumores na cavidade oral. Tal aumento é proveniente das mudanças ocorridas no comportamento sexual (prática oro-sexual) (SMITH *et al.*, 2012).

Alimentação pobre em nutrientes, a falta de higienização bucal e a exposição ocupacional, ou seja, a exposição crônica de trabalhadores a agentes carcinogênicos presentes no ambiente de trabalho pode contribuir para aumentar as taxas de desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço (TALAMINI *et al.*, 2002; SANDOVAL, 2011).

A tabela 1 mostra a relação entre alguns carcinógenos utilizados em diferentes profissões responsáveis por ocasionar esse tipo de neoplasia.

Tabela 1 - Relação entre alguns agentes carcinogênicos e algumas ocupações para o desenvolvimento de CECP.

OCUPAÇÕES	AGENTES CARCINOGENÉTICOS	TIPOS DE CÂNCER
Carpinteiro, forneiro, sapateiro e cabeleireiro	Formaldeído, amianto, poeira de madeira, radiação ionizante	Cavidade nasal e sinusal
Pintor, sapateiro, pedreiro e modelador de vidro	Solventes orgânicos, poeira de couro, de cimento e sílica	Cavidade oral, faringe e laringe

Fonte: INCA. “As profissões e o câncer”, [s.d.] (Adaptado). Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/4ea0ac004eb693bb8a669af11fae00ee/vigilancia_rc17.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 07 Jul. 2018.

3.5.3 Campo de cancerização

O contato frequente com agentes carcinogênicos pode promover a acumulação de danos genéticos nas células contribuindo para o desenvolvimento de tumores. No CECP, esse contato pode resultar em um processo denominado de campo de cancerização (DAKUBO *et al.*, 2007; JEMAL *et al.*, 2014).

O campo de cancerização refere-se à um processo em que as células não neoplásicas apresentam um grau de modificação genética, porém o seu aspecto histológico apresenta-se normal (SLAUGHTER *et al.*, 1953).

Estas quando próximas de células neoplásicas apresentam uma tendência anaplásica¹⁶, fazendo também parte desse campo de transformação tumoral. Tal fato, aumenta as chances dessas células se transformarem em malignas (SLAUGHTER *et al.*, 1953).

Desse modo, o surgimento do CECP não é um fenômeno celular isolado e sim, as células não neoplásicas que estão coexistindo com células tumorais participam do processo de carcinogênese (SLAUGHTER *et al.*, 1953; DAKUBO *et al.*, 2007).

Além das diversas situações ambientais, outros fatores como o tempo, a idade e o sexo apresentam uma relação direta com o potencial de risco e são determinantes no

¹⁶ Quando as células apresentam uma alta potencialidade de tornarem-se malignas.

processo de origem do CECP e outras neoplasias malignas (BLOT *et al.*, 1988; D'SOUZA *et al.*, 2009; JEMAL *et al.*, 2014).

Sendo assim, adotar medidas preventivas é uma estratégia excelente para minimizar os riscos e os impactos genéticos ocasionados por substâncias tóxicas. Ademais, a modificação de hábitos comportamentais e alimentares contribui para reduzir a ação dos agentes carcinogênicos e pode, ainda, diminuir as chances de uma progressão tumoral de cabeça e pescoço (PETERSEN, 2009).

3.5.4 Metástase cervical

Como já citado, o processo de metástase é conhecido como um mecanismo de invasão celular aos tecidos adjacentes por meio da corrente sanguínea e sistema linfático, atravessando vasos e extravasando para órgãos mais distantes (GRUPTA; MASSAGUE, 2006).

Para tal processo, múltiplas etapas ocorrem de forma sequencial para que as células malignas consigam adquirir a capacidade de desprendimento tecidual e migrar para outros órgãos crescendo de modo desordenado dando origem aos tumores secundários (HURST; ECMONDAS; WELCH, 2009).

No caso dos tumores de cabeça e pescoço, o processo metastático frequentemente ocorre através do sistema linfático, sendo os linfonodos o principal meio de disseminação das células malignas aos outros sítios (JACKSON, 2007).

Este tipo de metástase recorrente no CECP promove uma redução drástica na eficiência do controle da doença. De acordo com estudos, pacientes sem metástase linfonodal apresentam uma taxa de sobrevida entre 63 e 86% dentro de 5 anos, já aqueles com metástases a taxa é reduzida para 30% (LIM *et al.*, 2004). Dessa forma, a presença de metástase nesse tipo tumoral é um fator importante para delinear os métodos terapêuticos e definir o prognóstico da doença.

3.6 DIAGNÓSTICO, ESTADIAMENTO E TRATAMENTO DE NEOPLASIAS

A detecção de uma neoplasia requer análises criteriosas para identificar a localização do sítio de origem tumoral (HADDAD; ANNINO; TISHLER; 2008). A história clínica e a análise de sinais e sintomas durante uma avaliação física são

procedimentos fundamentais para diagnosticar corretamente qualquer doença, inclusive uma neoplasia maligna (HADDAD; ANNINO; TISHLER; 2008).

Após a localização do sítio primário, biópsias¹⁷ seguidas de análises histopatológicas¹⁸ irão comprovar a presença de uma neoplasia maligna (CARVALHO *et al.*, 2015). Os exames de imagens (tomografia computadorizada, ressonância magnética, etc.) investigarão o tamanho desse tumor, se há invasão de células nos tecidos adjacentes, a extensão da doença e o seu estágio de progressão (CARVALHO *et al.*, 2015; BHARGAVA *et al.*, 2016).

Por fim, o paciente é classificado segundo o sistema TNM (Tumor, Nódulo Linfático e Metástase) (CARVALHO *et al.*, 2015). Esse sistema fundamenta-se na expansão anatômica da doença e tem como base avaliar a dimensão, ou seja, o tamanho e localização do tumor primário (T), a extensão da disseminação em linfonodos (N) e se há ou não metástases à distância (M) (KANE *et al.*, 2006).

Cada um dos parâmetros TMN recebem graduações, variando de T0 a T4 para o tumor primitivo, N0 a N3 para o comprometimento linfático e M0 a M1 para determinar a presença ou ausência de metástases (INCA, “Fisiopatologia do Câncer, Cap. 2, [2018]).

A combinação dessas variações determina o estágio de progressão tumoral (CARVALHO *et al.*, 2015). Identificado esse estágio tumoral, os métodos terapêuticos são selecionados e os pacientes encaminhados para o tratamento (BERNIER *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2015).

Basicamente, no tratamento do câncer três modalidades são utilizadas: quimioterapia, radioterapia e ressecção cirúrgica. Dependendo do tipo e do estadiamento da neoplasia maligna, esse tratamento pode ser feito pela combinação concomitante dessas possibilidades terapêuticas (KANE *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2015).

O sucesso para um tratamento eficiente e conseqüente redução nas taxas de mortalidade dos pacientes acometidos por tal patologia depende de uma detecção nos estágios iniciais da neoplasia (CARVALHO *et al.*, 2015).

Atualmente, as técnicas utilizadas para realizar o diagnóstico e o monitoramento dessas doenças, apesar dos avanços relevantes realizados, ainda apresentam uma eficiência limitada (MAIGA *et al.*, 2017; MATHEWS; BULMAN; RYAN, 2017).

¹⁷ Processo de ressecção cirúrgica para a retirada de tecidos vivos para verificar a presença de um tumor, por exemplo.

¹⁸ Análise microscópica de tecidos com possíveis lesões.

Devido a identificação da doença ser feita apenas pela expansão anatômica tumoral por meio das técnicas tradicionais de diagnóstico, muitas vezes um tumor maligno acaba sendo detectado tardiamente, permitindo que células malignas se disseminem do sítio primário para tecidos mais distantes (JACKSON, 2007).

Para o CECP isso é um grande problema, pois as metástases cervicais reduzem a eficácia do tratamento e, conseqüentemente diminui a sobrevivência do paciente (KWONG *et al.*, 1994).

O tempo de detecção, portanto, é essencial para a promoção da cura do câncer (MAIGA *et al.*, 2017; MATHEWS; BULMAN; RYAN, 2017). Processos como identificação e comprovação da doença, dependem de várias etapas, como já foi apresentado, para estabelecer dados conclusivos sobre a saúde do paciente. Entretanto, a longa duração desses processos contribui para agravar a patologia, diminuindo a eficácia dos tratamentos (JACKSON, 2007; CARVALHO *et al.*, 2015; MAIGA *et al.*, 2017).

Além disso, os custos para a realização de diagnósticos e tratamentos são elevados, assim, devido à precariedade nos sistemas públicos de saúde, não é possível suprir as necessidades dos pacientes provocando atrasos na identificação e tratamento de tumores malignos, fato que influencia diretamente no prognóstico¹⁹ e evolução da doença (CAZAP *et al.*, 2016; SZABO *et al.*, 2017; SUHAG *et al.*, 2017).

Desse modo, mesmo com todos os avanços ocorridos na oncologia, incluindo os avanços nas técnicas de detecção, de tratamento e nos medicamentos de câncer, estudos mostram que essa doença continua sendo ameaçadora à população devido ao fato de as incidências de mortalidade só estarem aumentando (ARGIRIS *et al.*, 2008; HCB, 2016).

Isso evidencia uma necessidade notória em buscar técnicas mais sensíveis, acuradas, rápidas, com um custo acessível e que apresentem especificidade no reconhecimento de biomoléculas capazes monitorar o desenvolvimento de tumores (SALVATI; STELLACCI; KROL, 2015).

Estudos moleculares têm mostrado um papel importante e promissor na identificação e validação de biomarcadores neoplásicos com grande acurácia capazes de determinar o estadiamento dos tumores, aprimorar as técnicas de diagnósticos bem como contribuir para aumentar a expectativa de vida dos pacientes (HANASH; BAIK; KALLIONIEMI, 2011).

¹⁹ É a previsão feita sobre o andamento e evolução de uma determinada doença.

3.7 BIOMARCADORES MOLECULARES DE NEOPLASIAS

O conceito de biomarcador remete à mensuração das respostas biológicas de determinado organismo decorrente de uma desordem na homeostasia provocada pelo estresse ambiental. Estes podem ser classificados como: molecular, bioquímico, morfofisiológico e comportamental (ORGANIZATION; SAFETY, 1993)

Os biomarcadores, comumente, são utilizados na prática clínica para diagnosticar, monitorar e até mesmo identificar os riscos de ocorrência de determinada patologia. Além disso, previsões de prognósticos e a determinação dos estágios de progressão de doenças são outras utilidades desses marcadores biológicos no campo da medicina (TAKES, 2004; HANASH; BAIK; KALLIONIEMI, 2011).

Dentre os biomarcadores moleculares existentes, os microRNAs estão recebendo bastante atenção em se tratando dos estudos associados ao câncer (WANG; CHEN; SEN, 2016). De acordo com pesquisas, diferentes níveis de expressão dessas biomoléculas foram observados em vários níveis da progressão tumoral e isso contribuiu na utilização de microRNAs como marcadores moleculares capazes de fornecer informações suficiente para ter uma aplicação em técnicas de diagnóstico e tratamento do câncer (OLSON, 2009; WANG; CHEN; SEN, 2016).

3.7.1 MicroRNAs

Os microRNAs, classificados como RNAs que contém aproximadamente entre 20 a 24 nucleotídeos em sua estrutura, são moléculas que não codificam proteínas, porém apresentam um papel importante na regulação da expressão de vários genes, dentre os quais o controle de oncogenes e genes supressores tumorais (AMBROS, 2004; WANG; CHEN; SEN, 2016).

Os mecanismos regulatórios que regem a expressão gênica envolvem processos de decodificação do DNA e sua ação está intrincada ao comando de quais genes serão expressos, qual será a quantidade desses genes necessários para o ordenamento e funcionamento da maquinaria celular e, ainda, tem o total domínio sobre o momento certo para essa expressão (AXTEL *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015).

É de amplo conhecimento que mais de 60% de todos os genes codificantes, com inclusão dos genes responsáveis pelos mecanismos regulatórios, apresentam ao menos

um sítio conservado para a ligação de microRNAs, contudo, sítios não conservados também podem existir (AMBROS, 2004; FRIEDMAN *et al.*, 2009).

Os níveis de expressão dos genes responsáveis por essa manutenção celular (“housekeeping”) devem ser expressos constitutivamente em todas as células. Todavia, a desregulação da biogênese e função de microRNAs pode interferir na expressão desses genes e provocar desordens celulares, frequentemente associadas ao surgimento de patologias como, por exemplo, o desenvolvimento de neoplasias malignas (MARGUILAR *et al.*, 2013).

A biogênese dos microRNAs, demonstrada na figura 6, tem início na medida em que seu gene correspondente é transcrito pela RNA polimerase II. Essa primeira etapa que acontece no núcleo celular é responsável pela produção dos pri-miRNAs, precursores primários na forma de grampo. Ainda no núcleo, há o processamento desses precursores por um complexo, composto pela proteína de ligação DGCR8 e pela RNaseIII Drosha (CARVALHO *et al.*, 2015)

Após o microprocessamento que ocorre por meio de eventos de metilação e clivagem, os transcritos primários são transformados em uma estrutura com aproximadamente 85 nucleotídeos, denominados de pré-miRNAs, o qual é transportado para o citoplasma pela enzima exportin-5. No citoplasma, os pré-miRNAs são processados por um complexo proteico contendo as enzimas: Dicer e RNase III. Ambas agem transformando essas moléculas em um duplex miRNA/miRNA com cerca de 20-22 nucleotídeos (CARVALHO *et al.*, 2015).

Quando esse duplex é desenrolado, há a formação de um microRNA de fita simples maduro que é incorporado ao complexo RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA) e, juntamente, proteínas-chave como AGO2 e GW182 atuam promovendo o silenciamento pós-transcricional de genes por meio da interação com as sequências na porção 3'UTR (não traduzida) de RNAs mensageiros (CARVALHO *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2016).

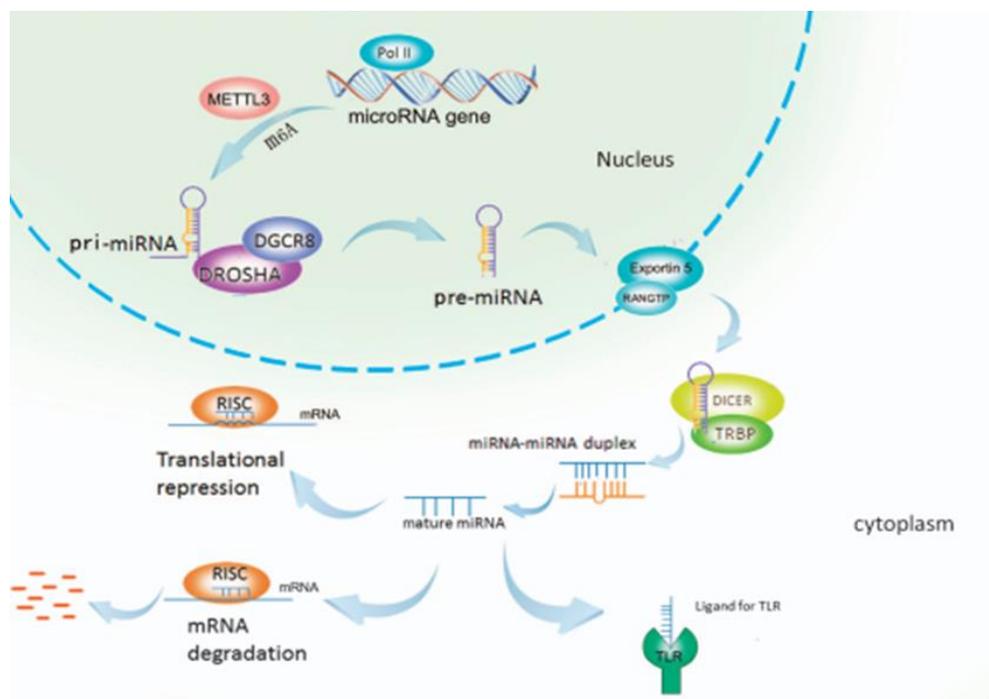
Essa interação pode ocasionar a clivagem, a degradação e até mesmo a repressão translacional dos mRNAs por meio da complementaridade de bases nitrogenadas. Cada microRNA é responsável por controlar a expressão de uma variedade de RNAs mensageiros (AMBROS, 2004).

Entretanto, um único mRNA pode ser alvo de múltiplos microRNAs e, dessa forma, a expressão irregular e anormal dessas biomoléculas pode afetar os transcritos e influenciar na desregulação de mecanismos de sinalização, desde vias que controlam a

divisão até mesmo os processos de morte celular relacionados ao desenvolvimento tumoral (TANG *et al.*, 2016).

Um exemplo que pode ser citado referente aos efeitos dessas biomoléculas nos mecanismos de sinalização é a sua atuação como ligante de receptores Toll-like (TLR) na via de inibição da produção de E-caderinas. Fato que contribui para desencadear os eventos de metástases, uma vez que tal inibição desencadeia o desprendimento celular via transição epitélio-mesenquimal (TANG *et al.*, 2016).

Figura 6 - Biogênese dos microRNAs. A imagem mostra a transcrição do gene de microRNA. O pri-miRNA é marcado por METTL3 e reconhecido pelo complexo microprocessador: DGCR8 e RNase III Droscha. Após o seu processamento, forma-se o pré-miRNA que é transportado ao citoplasma pela Exportin-5 para ser processado pelas enzimas Dicer e RNase III. O duplex produzido é desenrolado formando o miRNA maduro. A incorporação no complexo RISC pode promover o silenciamento ou a degradação de mRNA. Ou ainda, permitir a ligação de miRNAs em receptores TLRs para atuar em vias de sinalização celular.



Fonte: PENG; CROCE, 2016.

Os microRNAs, portanto, podem apresentar uma ação oncogênica, atuando como oncomiRs na origem tumoral bem como podem agir como supressores de tumores, inibindo o crescimento desordenado de células (ESQUELA-KERSCHER; SLACK; 2006; WIGGINS *et al.*, 2010). Dessa forma, tanto células saudáveis quanto células

neoplásicas podem expressar essas biomoléculas, porém, as quantidades expressas são diferentes em ambas as células (MITCHELL *et al.*, 2008).

Uma vez que são protegidos da atividade da RNase endógena²⁰ e apresentam expressões diferenciadas contribuindo na caracterização de células normais e anormais, os microRNAs podem ser considerados importantes biomarcadores de neoplasias malignas (ESQUELA-KERSCHER; SLACK; 2006; MAR-AGUILAR *et al.*, 2013).

3.7.2 MicroRNAs e as neoplasias malignas

Como citado anteriormente, os microRNAs podem ter uma ação oncogênica, contribuindo para o desenvolvimento de tumores ou podem atuar como supressores tumorais, que de modo antagônico inibem o crescimento desordenado das células (EYHOLZER *et al.*, 2010).

Estudos demonstram que, se um microRNA atua como supressor tumoral sua expressão é alta em células saudáveis, enquanto que em células cancerosas está subexpresso (ESQUELA-KERSCHER; SLACK; 2006). Por outro lado, quando apresenta uma função de oncogene, os microRNAs estão em baixas quantidades nas células normais e a superexpressão é observada em células anormais (WIGGINS *et al.*, 2010).

Apesar de toda essa relevância, estudos com essas biomoléculas tiveram início há um pouco menos de três décadas devido ao dogma central da biologia molecular destinar esforços apenas às moléculas codificantes e acreditar que somente as moléculas responsáveis por codificar proteínas eram importantes para o entendimento do funcionamento dos mecanismos genéticos celulares (ALMEIDA; REIS; CALIN, 2011; RICE *et al.*, 2015).

Foi no ano de 1993 que o primeiro microRNA foi descoberto: o lin-4 uma proteína responsável por controlar o desenvolvimento do estágio larval de *Caenorhabditis elegans* (BARTEL, 2004). Somente em 2001 que a importância dessas biomoléculas no controle de pelo menos metade do transcriptoma humano teve o seu devido reconhecimento e, em 2002, um estudo associando os microRNAs às neoplasias malignas foi publicado. Nesse estudo, houve a comprovação da função dos miR-15 e miR-16 como supressores tumorais em casos de leucemia (CALIN *et al.*, 2002; BARTEL, 2004).

²⁰ Enzimas que estão associadas aos eventos de degradação de mRNAs.

Atualmente, com todo o conhecimento que já se tem a respeito dos microRNAs e de suas funções regulatórias envolvendo os mecanismos de crescimento celular, proliferação, diferenciação e apoptose, estudos vêm demonstrando um enorme interesse na utilização dessas biomoléculas como marcadores moleculares em diversas patologias, inclusive nos casos de CECP e outras neoplasias na busca por novos métodos de diagnósticos e terapias mais eficazes (OLSON *et al.*, 2009; WANG; CHEN; SEN, 2016).

3.7.3 CECP e os microRNAs

Em estudos envolvendo o CECP, a recidiva local e de metástases à distância após o tratamento são fatores bastante recorrentes. Desse modo, a busca por um método de diagnóstico para detectar a doença em estágios iniciais é de suma importância para aumentar as taxas de sobrevivência dos pacientes (DUVVURI *et al.*, 2004; HADDAD *et al.*, 2008).

Além disso, a detecção de metástases linfonodais em pacientes com CECP é extremamente importante para aumentar a eficiência do controle da doença, como descrito anteriormente (GRANDI *et al.*, 1985; DIAS *et al.*, 2001; FERLITO *et al.*, 2006).

Sabendo que, atualmente a avaliação clínica nem sempre é eficiente, devido não conseguir identificar a presença de metástases ocultas e que os métodos convencionais não apresentam uma alta sensibilidade de detecção metastática, a utilização de marcadores específicos, como o uso de microRNAs pode contribuir para melhorar as técnicas diagnóstico, pois são altamente sensíveis e sua expressão determinante na diferenciação de tecidos saudáveis e doentes (OLSON, 2009; MITCHELL *et al.*, 2008; WANG; CHEN; SEN, 2016)

Carvalho *et al.*, 2015 mostrou em um estudo, que os microRNAs 203 e 205 são marcadores ideais na identificação de metástase linfonodal, pois apresentam uma alta taxa de expressão no epitélio escamoso e uma redução dessa taxa em linfócitos quando em condições normais. Já em condições neoplásicas a presença de tais biomarcadores no linfonodo indica a disseminação de células epiteliais caracterizando o processo de metástase cervical (CARVALHO *et al.*, 2015).

3.7.3.1 MicroRNA 203

O miR-203 é um supressor tumoral que apresenta um papel fundamental no controle da proliferação e diferenciação celular, bem como em processos que inviabilizam a invasão e transição epitélio-mesenquimal de células modificadas (OBAYASHI *et al.*, 2016). Sua ação está associada ao processo de diferenciação de queratinócitos e de proliferação de células epidérmicas (YI *et al.*, 2008).

Sabe-se que o processo de regeneração da epiderme é fundamentado por um equilíbrio entre proliferação e diferenciação das células produtoras de queratina. Dentro da normalidade, os mecanismos para tal processo são dependentes do fator de transcrição p63, uma proteína da família p53. O papel do miR-203, nesse caso, é inibir a isoforma desse fator de transcrição, $\Delta Np63\alpha$, promovendo então, a redução da proliferação dos queratinócitos para que o processo de diferenciação celular seja iniciado (LENA *et al.*, 2008).

Nas células em que ocorre a deleção de p63, a regulação negativa do microRNA promove a diminuição de sua expressão nos queratinócitos e, conseqüentemente o desenvolvimento do CECP. Estudos demonstram que o aumento da expressão da isoforma da proteína p63 é responsável por aproximadamente 80% das neoplasias primárias de cabeça e pescoço (ROCCO *et al.*, 2006).

Uma outra função associada ao miR-203 é o de impedir a invasão e a transição epitélio-mesenquimal de células transformadas, ou seja, inibir o desenvolvimento de metástases através da supressão dos fatores ZEB1 e ZEB2 (OBAYASHI *et al.*, 2016).

Tal supressão impede a ação da SNAI2 e permite que a expressão do gene E-caderina origine uma proteína central para promover a adesão intercelular mantendo a disposição do citoesqueleto (MOUSTAKAS; HELDIN, 2007).

Em estudos envolvendo o CECP, o alto potencial invasivo de suas células neoplásicas promove eventos que inibem a ação do miR-203 por meio de processos de hipermetilação ocasionando a repressão do gene E-caderina (KUDO *et al.*, 2003).

Esse evento proporciona a perda de adesão celular, devido a regulação negativa do microRNA dando às células a capacidade de movimentar-se através da corrente sanguínea e vasos linfáticos por meio da ativação do fator de transcrição NIAK1 (GREGORY *et al.*, 2008).

Durante esse processo, a transição epitélio-mesenquimal resulta na reprogramação molecular das células fazendo-as perder suas características epiteliais e adquirir

características mesenquimais que as tornam fusiformes para facilitar a migração do sítio primário aos novos tecidos (FIDLER, 2003).

3.7.3.2 MicroRNA 205

O miR-205 pode desempenhar uma ação oncogênica, permitindo o crescimento desordenado de células ou inibindo essa proliferação através de mecanismos de supressão tumoral (ZHANG *et al.*, 2016).

Assim como apresentado para o miR-203, a baixa expressão do miR-205 nas células inibe a regulação dos fatores de transcrição ZEB1 e ZEB2 e induz a transição epitélio-mesenquimal, fator importante para o desenvolvimento de tumores invasivos (MCKENNA *et al.*, 2010).

Estudos ainda comprovam que o fator de transcrição p63 tem um papel determinante na regulação desse microRNA, no que se refere ao processo inibitório da invasão celular. Todavia, o aumento da expressão $\Delta Np63\alpha$ contribui para induzir a migração de células malignas aos tecidos adjacentes (QIN *et al.*, 2013; TRAN *et al.*, 2013).

No que se refere ao CECP, o miR-205, assim como o miR-203 estão associados de forma acurada às metástases linfonodais, mostrando a sua relevância como biomarcador metastático de neoplasias malignas de cabeça e pescoço (CARVALHO *et al.*, 2015).

3.7.3.3 MicroRNAs 203 e 205: Biomarcadores neoplásicos circulantes

Os miR-203 e 205 também podem ser considerados biomarcadores potenciais de tumores circulantes, uma vez que tais moléculas podem ser detectadas no espaço extracelular (MA *et al.*, 2014; ZAVESKY *et al.*, 2015).

Os exossomos, pequenas vesículas produzidas pelos diferentes tipos celulares, são considerados o principal meio de disseminação de tais marcadores neoplásicos. De acordo com pesquisas todas as células, inclusive as células malignas liberam essas vesículas na corrente sanguínea ou nas vias linfáticas (LUDWIG; GIEBEL, 2012).

Desse modo, produtos como proteínas, material genético, mRNAs e microRNAs recobertos por uma membrana são liberados nos fluídos corpóreos e passam a circular na

saliva, sangue, soro, linfa até migrar para um órgão específico do corpo e, desenvolver um sítio tumoral secundário (SCHOREY; BHATNAGAR, 2008).

A presença de antígenos tumorais e outros biomarcadores nos exossomos permitem então, a realização de um estudo mais aprofundado para criar e aprimorar os métodos para diagnosticar indivíduos com CECP e, ainda promover a prevenção de metástases cervicais, uma vez que tais moléculas presentes nessas vesículas permite avaliar a progressão da doença (GIAU; A.AN, 2016).

Desse modo, verificada tal importância dos microRNAs na manutenção da maquinaria celular e a sua contribuição na identificação de diferentes patologias incluindo o CECP, o desenvolvimento de novas técnicas para detectar esses biomarcadores moleculares é necessário. A nanotecnologia pode ser uma ferramenta interessante no que se refere à criação de produtos novos e técnicas de detecção altamente sensíveis (SALVATI; STELLACCI; KROL, 2015).

3.8. NANOTECNOLOGIA

Com a descoberta de biomarcadores moleculares, nos quais os microRNAs estão incluídos, os métodos convencionais tornaram-se menos precisos na detecção de pequenas quantidades expressas de biomoléculas em um material biológico. Assim, o desenvolvimento de técnicas que sejam altamente sensíveis e específicas no reconhecimento de microRNAs, bem como técnicas que apresentem um baixo custo de análise têm se tornado um grande desafio para os estudos biomédicos (HOWES; RANA; STEVENS, 2017).

A nanotecnologia é uma área recente que vem dando suporte à produção de técnicas inovadoras, uma vez que possibilita o controle das propriedades físico-químicas da matéria através da manipulação de átomos e moléculas, com o intuito de criar novos dispositivos em escala nanométrica (tipicamente inferior a 100 nm) que apresentem uma organização molecular diferenciada (SEKHON, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2016).

Tal possibilidade que essa ciência traz em relação à modificação do arranjo de átomos e moléculas contribui na síntese de produtos mais resistentes, mais baratos e mais sensíveis. Além disso, a exploração de suas características permite que tais produtos possam ser aplicados em diversos estudos (PITKETHY, 2003; CARLES; HERMOSILLA, 2008; CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014).

Atualmente, a nanotecnologia está sendo amplamente associada aos estudos biomédicos. A compatibilidade de tamanho entre os nanomateriais e as biomoléculas permite a utilização de materiais nanoestruturados em processos de transdução de sinal para investigar de forma rápida e eficiente os mecanismos biológicos (Figura 7) (PITKETHY, 2003; CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014).

Isso porque as propriedades de reconhecimento molecular relacionam-se com as propriedades elétricas, ópticas, magnéticas e catalíticas das nanopartículas. Além do tamanho, sabe-se hoje que a modificação da forma, do arranjo, da orientação e ainda, modificação química ou biológica da superfície desses nanomateriais são características importantes no desenvolvimento de produtos com propriedades únicas (WILLNER; WILLNER, 2010).

Figura 7 - Comparação entre os nanomateriais e as biomoléculas.

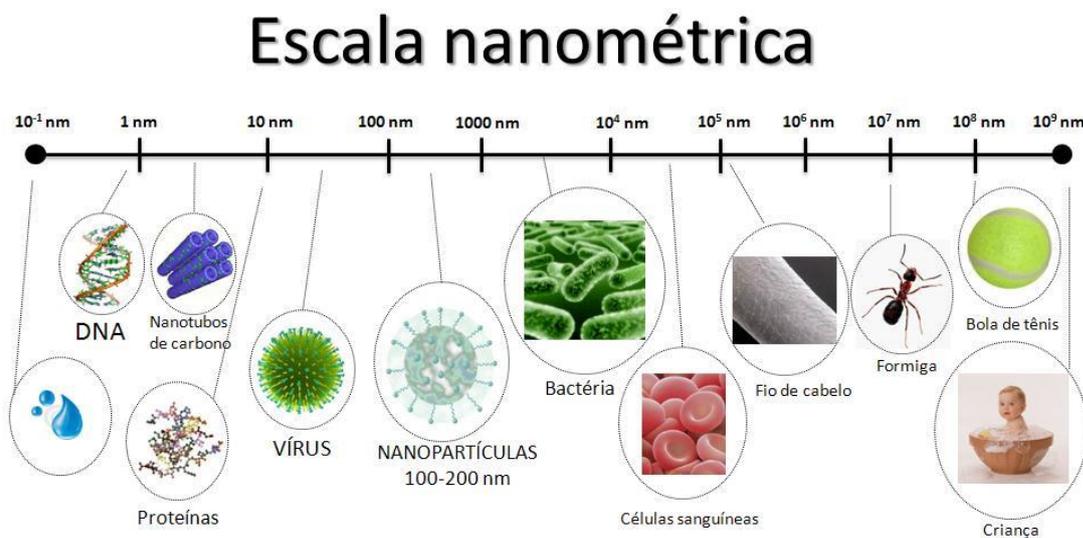


Figura: Cândice Felippi

Fonte: FELLIPI, 2013.

Muitos consideram que os estudos em Nanotecnologia tiveram início em 1959, quando Richard Feynman apresentou numa conferência na Califórnia, uma visão tecnológica de miniaturização, demonstrando que átomos poderiam ser manipulados para a fabricação de novos produtos (FEYNMAN, 1960).

Outros acreditam que tais avanços ocorreram somente décadas depois, em 1980, com o desenvolvimento do microscópio de varredura por tunelamento e, posteriormente

o desenvolvimento do microscópio de força atômica os quais permitiram manipular, visualizar e caracterizar de forma mais detalhada os materiais nanométricos (EIGLER; SWEIZER, 1990; BUSHAN, 2004).

Foi a partir dos anos 2000, que a importância dessa ciência de alta tecnologia ficou ainda mais evidente. Desde então, as pesquisas em nanotecnologia cresceram e diversas aplicações associadas a esse campo interdisciplinar vem sendo empregadas nas mais diferentes áreas do conhecimento (BUSHAN, 2004).

3.8.1 Nanomateriais aplicados em estudos biomédicos

A aplicação da nanotecnologia em estudos biomédicos, principalmente em técnicas de diagnósticos de patologias e tratamento médico, tem sido o foco de muitos pesquisadores nos últimos 30 anos (SINGH, 2017).

Os altos custos, os limites de detecção insuficientes e os procedimentos demorados dos métodos convencionais deram origem a uma nova ferramenta com alta sensibilidade no reconhecimento de biomoléculas que impulsionou o desenvolvimento e a aplicação de nanomateriais na medicina tradicional (LIN; LIN; WANG, 2014).

O transporte de fármacos por meio de nanoestruturas foi uma das primeiras aplicações que alavancou os avanços tecnológicos em medicina. Nanoestruturas magnéticas e nanopartículas lipídicas conjugadas com biomoléculas são exemplos utilizados para transporte e liberação controlada de medicamentos (GILJOHANN *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011).

Atualmente, a nanomedicina vem dedicando seus esforços em integrar inovações na área da genômica e da proteômica, na busca de melhorias nas técnicas de análises clínicas, propondo métodos capazes de diagnosticar patologias em estágios iniciais e tratamentos mais pontuais para aumentar as taxas de sobrevivência e melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos por patologias debilitantes, como é o caso das neoplasias malignas (SALVATI; STELLACCI; KROL, 2015).

Tais avanços estão intrinsecamente associados à versatilidade e às propriedades que as nanoestruturas apresentam decorrente da miniaturização dos materiais capaz de promover um aumento da razão superfície/volume e gerar propriedades jamais observadas nos materiais em macroescala (RATYAKSHI, 2009).

Além disso, a facilidade de manipulação, de síntese, de funcionalização com biomoléculas e de modificação química permite a investigação de mecanismos biológicos

por meio de nanoestruturas biocompatíveis altamente sensíveis e específicas aplicáveis na detecção de muitas patologias (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010; NGHIEM *et al.*, 2010; RAVINDRAN; CHANDRAN; KHAN, 2013).

Desse modo compreender as propriedades dos nanomateriais é de suma importância para obter tecnologias que possam ser aplicadas à detecção de biomoléculas (GORUP *et al.*, 2011).

Dentre as diversas nanoestruturas que podem ser utilizadas na biomedicina, as nanopartículas metálicas exibem propriedades fotoquímicas que as tornam excelentes transdutores de sinais em sistemas de sensoriamento biológico (MOCK *et al.*, 2002).

3.8.2 Nanopartículas Metálicas

As nanopartículas metálicas, dentre as quais podemos destacar as nanopartículas de ouro e de prata, já eram utilizadas desde o século IV. Romanos utilizavam-se dessas partículas para produzir colorações diferentes em vitrais, à medida que a incidência de luz era alterada (KATZ; SHIPWAY; WILLNER, 2003).

Atualmente, são diversas as aplicações tecnológicas para tais nanomateriais, dentre elas destacam-se: os novos métodos de armazenamento de dados da indústria de informática, a produção de micro-sensores, a produção de pigmentos mais intensos nas indústrias têxteis e ação antimicrobiana em cosméticos (BARRAT, 2003).

Contudo, a fácil interação das nanopartículas metálicas com biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, anticorpos, entre outros) permitem um amplo potencial de aplicação na área médica, no que se refere ao desenvolvimento de nanobiossensores (MOCK *et al.*, 2002)

Os fortes sinais de intensidade de luz em processos de transdução de sinal e a ampla variedade dos métodos simples de síntese, modificação química e imobilização de biomoléculas na superfície das nanopartículas são grandes vantagens na criação de materiais dentro de uma escala compatível com as moléculas biológicas (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010; RAVINDRAN; CHANDRAN; KHAN, 2013).

Inúmeros estudos envolvendo a produção de nanobiossensores têm se concentrado na utilização de nanopartículas de ouro, pois tais partículas são mais estáveis quando comparadas aos compostos de prata. Todavia, as nanopartículas de prata exibem melhores propriedades fotoquímicas, uma vez que apresentam um pico de absorção simétrico e estreito, o que facilita uma análise de deslocamento de bandas em processos de interação

molecular. Os compostos de ouro, por outro lado, possuem um pico de absorção bastante assimétrico dificultando tal investigação (LISMONT; DREESEN, 2012).

Desse modo, as nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam um efeito de ressonância plasmônica maior quando comparada às de ouro (AuNPs), característica essencial para analisar a atividade de um nanobiossensor (LISMONT; DREESEN, 2012).

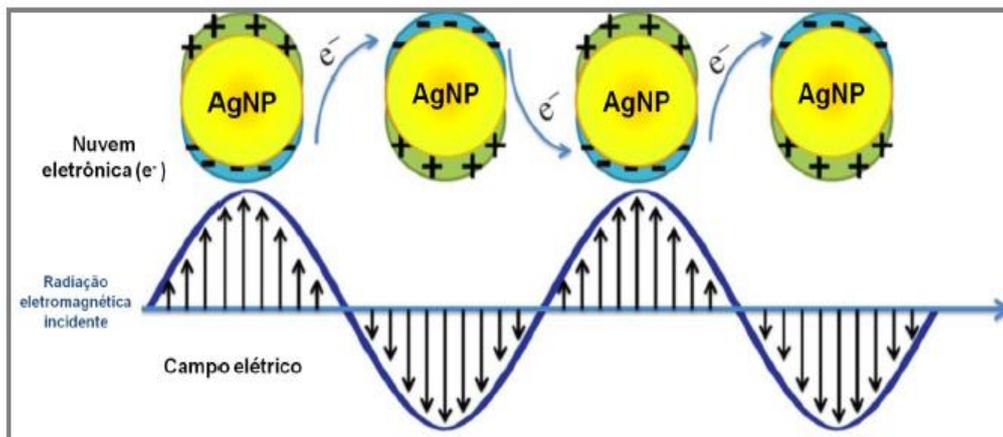
Ademais, os baixos custos de síntese e a produção de sinais ópticos mais evidentes durante o processo de reconhecimento de biomoléculas, viabilizam a sua aplicação em ensaios de detecção de moléculas biológicas específicas (LISMONT; DREESEN, 2012).

3.8.2.1 Propriedades ópticas

Como apresentado, todas as propriedades distintas inclusive as propriedades ópticas das nanopartículas apresentam uma relação direta com o tamanho, forma, distribuição e o meio no qual estão inseridas. Desse modo, controlar e avaliar essas características é um desafio dentro da nanotecnologia e de grande relevância para a criação de sensores (BRANDL; MIRIN, 2006).

O fenômeno óptico observado tanto nas AgNPs como AuNPs é proveniente de uma oscilação coletiva de elétrons que acontece na banda de condução do metal. Essa oscilação produz uma frequência de oscilação no interior da nanopartícula e, quando esta se torna igual à frequência da radiação eletromagnética incidente ocorre o fenômeno da ressonância plasmônica de superfície que pode ser observada através da produção de um pico de absorção na região visível do espectro eletromagnético (Figura 8) (MOCK *et al.*, 2002).

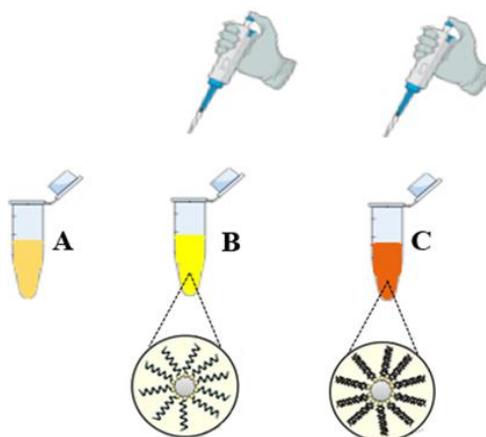
Figura 8 - Esquema representativo da oscilação plasmônica na superfície das nanopartículas metálicas em resposta à excitação da radiação eletromagnética.



Fonte: YASUN *et al.*, 2013.

Assim, quando as nanopartículas estão ligadas a moléculas biológicas para ter uma ação sensorial, a detecção do analito por esse complexo promove uma alteração na frequência de ressonância e, conseqüentemente as propriedades de absorção e espalhamento de luz são modificadas. Dessa forma, a alteração da frequência de ressonância está associada à uma mudança visível da coloração da suspensão (Figura 9) (MAHMOUDI *et al.*, 2011; ROSARIN; MIRUNALINE, 2011).

Figura 9 - Esquema representativo de um sensoriamento feito por nanopartículas de prata. O item (A) representa a nanopartícula sintetizada; (B) a funcionalização das nanopartículas com nucleotídeos. Nesta etapa nota-se uma mudança na intensidade da cor e, por fim, o item (C) representa a interação de hibridização do complexo Nanopartículas-oligonucleotídeo com o microRNA específico. O processo de detecção resulta na mudança de coloração devido à detecção do alvo.



Fonte: DO AUTOR.

Estudos demonstram que o pico máximo de absorção plasmônica para as AuNPs pode acontecer em qualquer região visível do espectro eletromagnético. Para as AgNPs, a absorção pode variar entre 400 e 670 nm (MARZÁN, 2004; PODLIPENSKY *et al.*, 2005).

Tais propriedades fotoquímicas evidentes, então, são altamente ajustáveis conforme a composição e tamanho das nanopartículas e, quando relacionadas com os mais variados métodos de síntese e técnicas de acoplamento de biomoléculas ou outros ligantes, as nanopartículas podem atuar como sondas fluorescentes ou sensores ópticos. Isso porque a interação com o analito emite um sinal óptico que é detectável a olho nu e, ainda em análises mais técnicas pode-se observar a modificação da posição e da intensidade da banda de ressonância plasmônica dessas partículas (MANSUR; MANSUR; GONZÁLEZ, 2011).

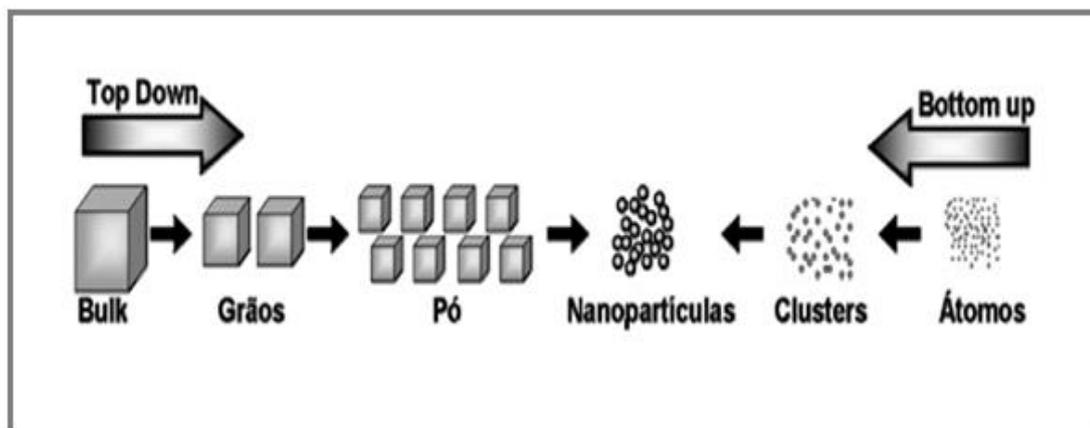
Dentro desse contexto, inúmeros estudos vêm destinando esforços na síntese, modificação química e aplicação das AgNPs como sensores ópticos para compreender e investigar de forma mais aprofundada diversas patologias (LISMONT; DREESEN, 2012).

3.8.2.2 Métodos de Síntese

O uso de AgNPs vem recebendo destaque nos últimos anos, no que diz respeito às aplicações biomédicas, industriais e criação de produtos antibióticos (BARRAT, 2003). Entender, portanto, como controlar o tamanho, forma e composição das nanopartículas, uma vez que suas propriedades ópticas, eletrônicas e magnéticas dependem diretamente de tais características é essencial para gerar produtos com propriedades específicas e aplicá-los nos mais variados estudos (GORUP *et al.*, 2011).

A produção de nanopartículas pode ser categorizada em *top-down* e *bottom-up*. Na primeira categoria, a produção inicia-se com o desgaste físico de um material em macroescala para a obtenção de nanoestruturas, já na segunda, o processo constitui-se em uma “montagem” átomo a átomo das nanoestruturas por meio de métodos de síntese química em fase líquida (Figura 10) (IRAVANI *et al.*, 2014).

Figura 10 - Rotas de síntese *Top-down* e *Bottom-up* para a obtenção de nanopartículas metálicas.



Fonte: GORUP *et al.*, 2010 (Adaptado).

Esses últimos são métodos mais baratos e mais eficientes, pois possibilitam um maior controle das nanopartículas. Estas, ainda, apresentam uma maior homogeneidade em formato (esferas, cubos, triângulos, bastões, entre outros) e, encontram-se dispersas na solução coloidal. Ao se tratar da produção de nanobiossensores para detecção de biomoléculas, esses métodos em fase líquida são mais recomendados. Isso porque, ambos favorecem a interação com biomoléculas e produzem nanopartículas monodispersas, contribuindo para eventos eficientes de detecção de analitos (TRAN; NGUYEN; LE, 2013).

Dentre os métodos mais utilizados destaca-se o método do citrato ou também denominado de Turkevich, devido a sua simplicidade e facilidade de execução, além disso a alta reprodutibilidade, rapidez e homogeneidade na produção de nanopartículas torna esse método bastante eficaz quando comparado às outras rotas de síntese química (TURKEVICH; STEVENSON; HILLER, 1951).

A versatilidade do método em modificar o tamanho das nanopartículas alterando somente a razão entre o agente redutor e o precursor metálico e a possibilidade de tornar o agente redutor como estabilizante das nanopartículas é também uma das vantagens desse método (TURKEVICH, 1985).

Em resumo, o processo de síntese química (*bottom-up*) envolve parâmetros como: tempo de reação, temperatura, pH e fundamenta-se na utilização de um precursor metálico, um agente estabilizante e um agente redutor. Tal processo se inicia quando o agente redutor promove a redução do precursor da prata metálica. Essa redução resulta

na produção de átomos neutros que se colidem gerando núcleos estáveis (processo de nucleação). Após essa etapa, os processos de colisão continuam e originam partículas maiores (etapa de crescimento). Finalmente, com o esgotamento dos íons metálicos há o recobrimento das partículas pelo agente estabilizante para garantir que não haja a sua aglomeração (EASTOE; HOLLAMBY; HUDSON, 2006; TRAN; NGUYEN; LE, 2013).

Desse modo, a estabilização das nanopartículas é um grande desafio em suspensões coloidais (GORUP *et al.*, 2011).

3.8.3 Estabilidade das nanopartículas metálicas

A colisão entre as nanopartículas metálicas é um processo resultante do aumento da energia total do sistema devido ao grande número de partículas presentes na suspensão coloidal. Na ausência de um estabilizante, esse choque efetivo tende a continuar promovendo a diminuição dessa energia e, como resultado, obtém-se a aglomeração das partículas (KRUTYAKOV *et al.*, 2008).

Desse modo, para controlar a estabilidade e entender o comportamento das partículas é imprescindível a utilização de moléculas que promovam uma interface entre a fase sólida (partículas) e a fase líquida (solvente) na qual as partículas estão dispersas (GORUP *et al.*, 2010).

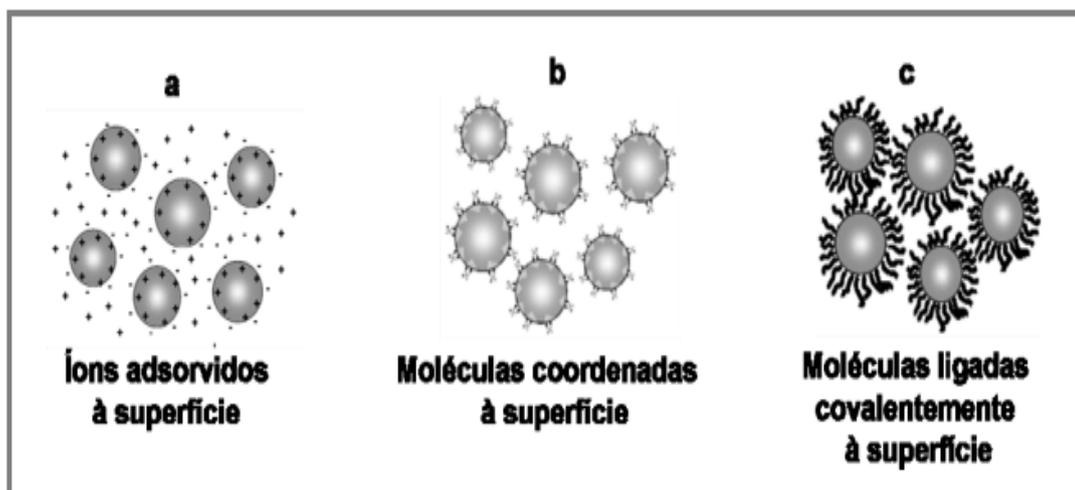
Diversos mecanismos indiretos, como aqueles que promovem a repulsão eletrostática, atração de van der *Waals* e até mesmo mecanismos estéricos podem atuar na estabilização, crescimento controlado e na produção monodispersa de nanopartículas metálicas (GORUP *et al.*, 2010).

Os mecanismos de estabilização eletrostática consistem em processos de adsorção física capazes de estabilizar as partículas no solvente. Neste caso, as partículas são recobertas por cargas elétricas devido à adsorção de íons do meio (Figura 11-a) ou de moléculas carregadas eletricamente atraídas pelas cargas opostas na superfície das nanopartículas metálicas, como ocorre no método do Citrato, por exemplo (Figura 11-b). Moléculas de água reorganizam o citrato na superfície das nanopartículas, processo que evita o efeito de aglomeração entre elas (SHAW, 1975; LAIDLER, 1993).

Essa camada protetora que se forma na superfície das nanopartículas as protegem da aglomeração devido a criação de uma barreira que promove repulsão das mesmas, visto que todas as partículas do sistema apresentam cargas superficiais de mesmo sinal (SHAW, 1975).

Os mecanismos estéricos promovem a estabilização das partículas através da passivação ou funcionalização decorrente da ancoragem de moléculas em superfície por meio de ligações covalentes (Figura 11-c) (MEKHALIF *et al.*, 2008).

Figura 11 - Esquema representativo dos mecanismos de estabilização de nanopartículas: (a) estabilização eletrostática que ocorre devido a adsorção de íons na superfície das nanopartículas, (b) estabilização eletrostática devido a adsorção de moléculas orgânicas e (c) estabilização estérica por meio de ligações covalentes.



Fonte: XU *et al.*, 2006.

Diversos compostos podem ser utilizados como passivantes de nanopartículas metálicas impedindo a sua aglomeração, dentre eles, podem ser destacados alguns polímeros, surfactantes, o grupamento amina, amida, tiol, entre outros. Os grupamentos tióis são considerados os passivantes mais utilizados para modificar a superfície de nanopartículas de ouro e prata (EASTOE; HOLLAMBY; HUDSON, 2006).

A vantagem em se utilizar esses mecanismos estéricos é que a suspensão coloidal permanece estável por um período de tempo maior evitando a aglomeração e, a consequente precipitação do metal. Além disso, tais moléculas podem atuar no preparo da superfície das nanopartículas, modificando-a quimicamente e garantindo a sua ancoragem com biomoléculas para uma possível aplicação em estudos de sensoriamento biológico (ZHAO *et al.*, 2009).

3.8.4 Imobilização de biomoléculas

Depois de sintetizadas, as propriedades fotoquímicas exibidas tornam as nanopartículas de prata atrativas em sistemas de detecção. Ainda, o fato de as nanopartículas exibirem tamanhos compatíveis aos de entidades biológicas, a imobilização dessas partículas nanométricas com oligonucleotídeos, proteínas, anticorpos, entre outros, pode promover interações de reconhecimento de um analito-alvo, inclusive reconhecer biomarcadores moleculares (GARCÍA-BARRASA; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA; MONGE, 2011).

A modificação química da superfície das nanopartículas e, o posterior acoplamento com biomoléculas promove uma mudança em suas propriedades físico-químicas e, como resultado obtém-se a reorganização dessas partículas para interagir com a molécula alvo (NGHIEM *et al.*, 2010).

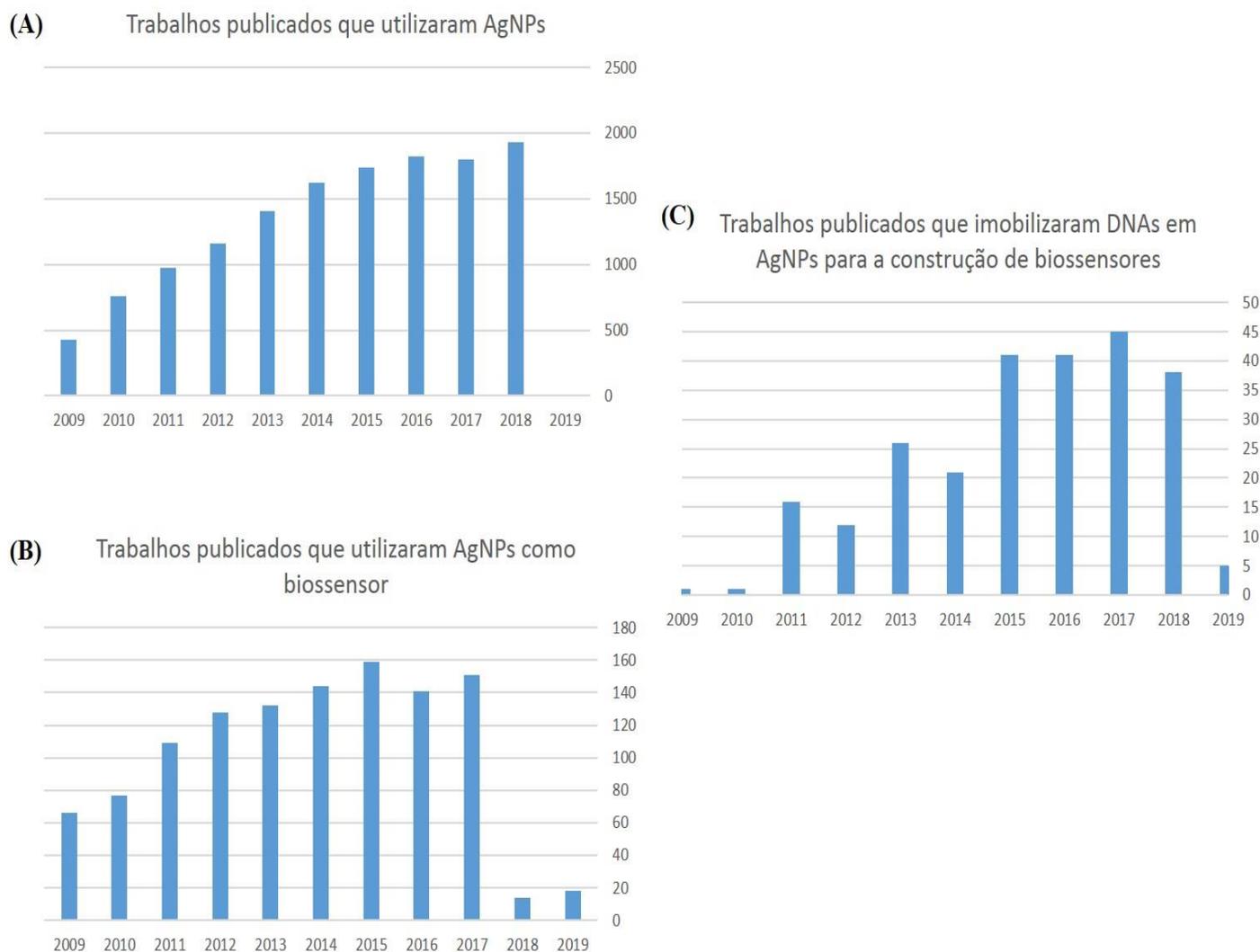
Esse processo, geralmente, favorece a solubilidade do sistema, otimizando os processos de interação das partículas com o meio e melhorando a biocompatibilidade desses nanomateriais devido a contribuição na formação de nanopartículas hidrossolúveis (GARCÍA-BARRASA; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA; MONGE, 2011).

A interação das partículas nanométricas com pequenas moléculas de DNA (oligonucleotídeos) orienta o sensor à molécula alvo específica. Tal reconhecimento promove uma sinalização que pode ser detectada e aferido após a associação por meio da complementaridade de bases nitrogenadas com microRNAs, por exemplo (YANG; VOSCH, 2015).

O DNA ou ácido desoxirribonucleico é um tipo de ácido nucleico responsável por armazenar e transmitir toda a informação genética dos organismos. É formado por duas cadeias antiparalelas de nucleotídeos em forma de hélice, sendo que a união dos nucleotídeos é feita por meio de ligações fosfo-diéster entre os carbonos 3' e 5' da base nitrogenada (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2012).

De acordo com a literatura, nos últimos 10 anos há poucos estudos envolvendo a imobilização de DNA na superfície de AgNPs para a construção de biossensores (PUBMED, [s.d]) (Gráfico 2-C). Todavia, tais moléculas biológicas possuem características interessantes para serem exploradas no desenvolvimento de novas técnicas de detecção de microRNAs específicos contribuindo com os avanços no diagnóstico e terapia de neoplasias malignas (SHAH *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2015).

Gráfico 2 – Número de publicações em valor absoluto que utilizaram AgNPs nos últimos 10 anos. (A) As publicações que utilizaram AgNPs em diversos estudos; (B) As publicações que utilizaram AgNPs para construir biossensores e (C) As publicações que imobilizaram DNA em AgNPs para a construção de nanobiossensores.



Fonte: PUBMED, Acesso em 24 de Março 2019.

3.8.4.1 Imobilização de DNA

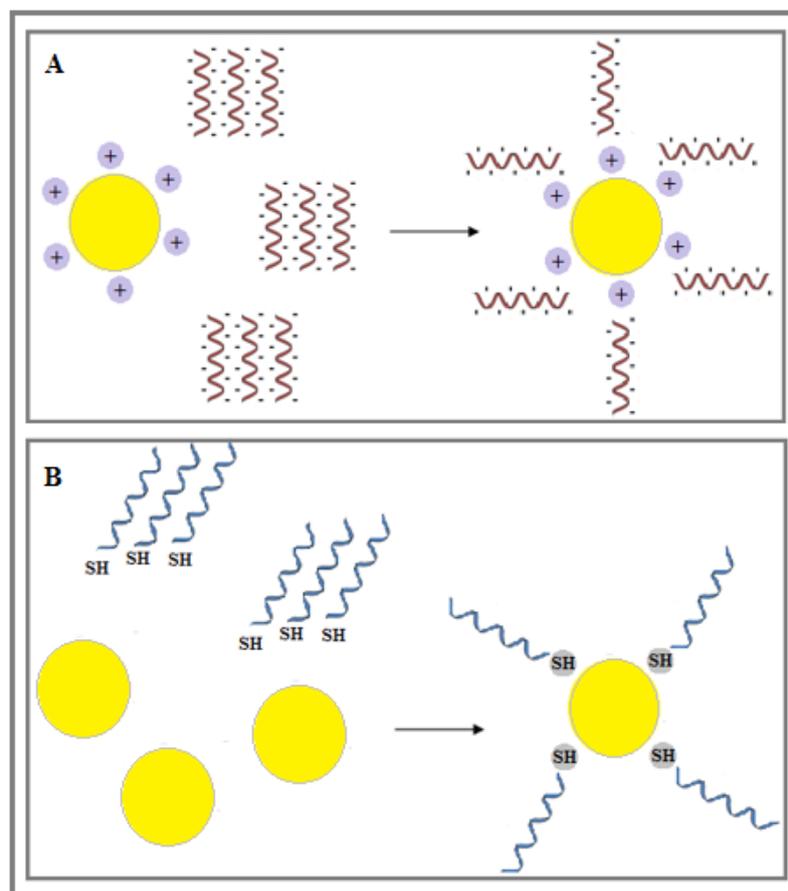
A imobilização de DNA envolve o processo modificação química da superfície das nanopartículas. Tal processo requer a utilização de reagentes que facilitem a ancoragem das moléculas por meio de (i) mecanismos de adsorção eletrostática entre o grupo fosfato da molécula e a superfície carregada positivamente ou (ii) mecanismos que promovam a imobilização por ligação covalente (Figura 12) (RASHID; YUSOF, 2017).

Na primeira abordagem, a modificação de alguns parâmetros como pH e temperatura pode reduzir a eficiência da imobilização, visto que tais fatores contribuem para o desprendimento das moléculas de DNA da superfície das partículas nanométricas e dificulta a hibridização com a molécula alvo (RASHID; YUSOF, 2017).

Na segunda abordagem, o processo de imobilização das pequenas moléculas de DNA, ou seja, imobilização de oligonucleotídeos pode ser favorecida pela ligação de grupos funcionais na superfície de nanopartículas. Grupos funcionais tióis na extremidade 3' ou 5' do DNA, por exemplo, podem se ligar à superfície de nanopartículas por meio de um compartilhamento de elétrons, facilitando a interação com essas moléculas orgânicas (TANG; DONG; REN, 2010; PUTZBACH; RONKAINEN, 2013).

Tal processo favorece uma orientação vertical das moléculas nas nanopartículas, aumentando a eficiência no reconhecimento do analito em estudos biomédicos (WANG *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2007).

Figura 12 - Mecanismos de imobilização de biomoléculas. (A) Imobilização por adsorção eletrostática e (B) Imobilização por ligação covalente.



Fonte: DO AUTOR.

Ambos mecanismos resultam na modificação das propriedades fotoquímicas das nanopartículas, gerando um efeito óptico importantíssimo para a aferição da detecção de moléculas específicas. Então, quando as nanopartículas de prata são imobilizadas com oligonucleotídeos, espera-se uma interação molecular de complementaridade de bases nitrogenadas com a molécula-alvo, por exemplo, com um microRNA específico. A hibridização é detectada pela mudança de coloração dessa solução coloidal (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

Dessa forma, o uso de nanopartículas de prata associadas às pequenas moléculas de DNA tem se tornado atrativa aos estudos oncológicos no que tange o desenvolvimento de técnicas rápidas, sensíveis e precisas para o diagnóstico de neoplasias malignas em estágios iniciais e tratamentos menos invasivos, uma vez que a exploração das propriedades físico-químicas em nanoescala permite uma sondagem em nível molecular de biomarcadores de neoplasias malignas, como é o caso dos microRNAs. Além disso, a aplicação desses dispositivos podem se tornar a chave para o aprimoramento dos estudos médicos atuais (MARANGONI; PAINO; ZUCOLOTTO, 2013).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

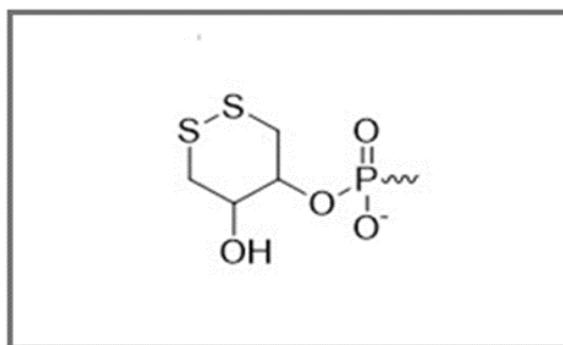
4.1.1 Obtenção dos miRNAs 203 e 205 e seus respectivos oligonucleotídeos complementares

As sequências de miRNAs 203 e 205, bem como seus respectivos oligonucleotídeos complementares são amostras comerciais sintetizadas pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies). Tais amostras foram fornecidas pelo Prof. Dr. Matias Eliseo Melendez, co-orientador deste trabalho, juntamente em colaboração com o Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos. Os oligonucleotídeos complementares comerciais foram sintetizados com uma modificação ditiol (DTPA) em sua extremidade 5'. Essa modificação é um ponto de ancoragem com dois grupos funcionais tióis (-SH) utilizada para promover o acoplamento de oligonucleotídeos às superfícies metálicas, como das nanopartículas de prata (GARG *et al.*, 2010). Tais informações podem ser visualizadas na figura 13.

Cada amostra comercial fornecida à esse trabalho foi diluída em água deionizada e estocada à -20 °C para evitar possíveis contaminações e, posteriormente serem utilizadas em análises futuras.

As informações fornecidas pelo fabricante acerca das especificações técnicas e propriedades dos miRNAs e oligonucleotídeos estão descritas na tabela 2.

Figura 13 - Modificação Ditiol (DTPA).



Fonte: “Dithiol (DTPA) linker”-Biosynthesis [2018].

Tabela 2 - Especificações das amostras de miRNAs e seus respectivos oligonucleotídeos fornecidas Empresa Integrated DNA Technologies (IDT).

	miR 203	miR 205	Oligo-miR 203	Oligo-miR-205
Sequência	5' - GTGAAATG TTTAGGAC CACTAG- 3'	5' - TCCTTCAT TCCACCGG AGTCTG- 3'	5'- / 5 DTPA / CTAGTGGTC CTAAACATT TCAC -3	5'- / 5 DTPA / CAGACTCCG GTGGAATG AAGGA -3'
Número de bases	22	22	22	22
Temperatura de Melting (TM)	50,9 °C	58,6 °C	50,9 °C	58,6 °C
Peso Molecular	6798,5 u.m.a	6637,3 u.m.a	6883,6 u.m.a	7047,7 u.m.a
Modificação	Sem modificação	Sem modificação	5' DTPA	5' DTPA
Formato de entrega da Amostra	Liofilizada	Liofilizada	Liofilizada	Liofilizada
Volume de água adicionado para preparar a solução ²¹	252 µL	290 µL	112 µL	76 µL
Concentração da Solução	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM

Fonte: DO AUTOR.

4.1.2 Síntese de nanopartículas de prata

Para a obtenção de AgNPs diferentes rotas de síntese podem ser empregadas, como foi apresentado anteriormente. Neste estudo, para a preparação da suspensão coloidal de prata, um método de redução química, conhecido como método do citrato foi utilizado (GORUP *et al.*, 2011). Todavia é válido ressaltar que este método foi

²¹ O Volume de água adicionado foi sugerido pelo fabricante para uma concentração de 100 µM.

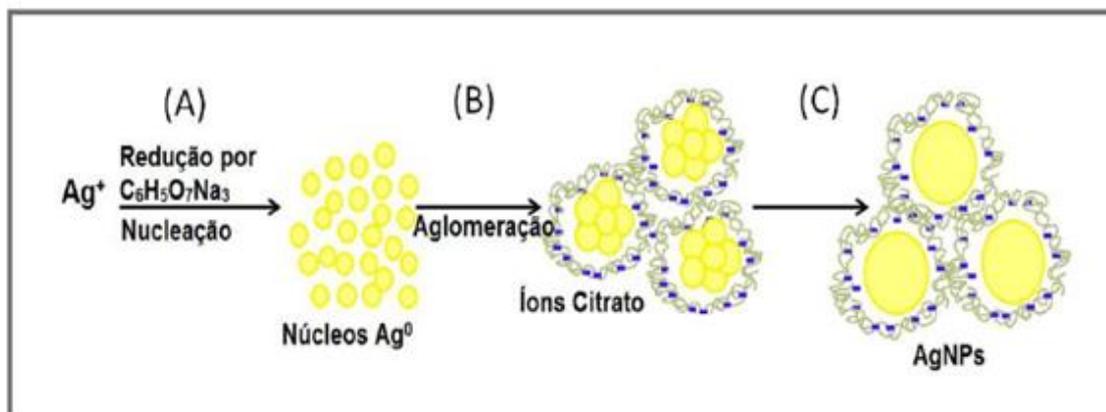
originalmente proposto por Turkevich em 1951 para a síntese de colóides de ouro, e, posteriormente adaptado por Lee e Meisel em 1982 para AgNPs.

A síntese de nanopartículas consistiu em uma reação de óxido-redução em meio aquoso entre o citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e o sal de prata (AgNO_3). Nesta estratégia metodológica, o citrato promove a redução dos íons metálicos (Ag^+) para a formação dos átomos de prata (Ag^0) e, quando estes últimos unem-se em um arranjo cristalino, há a formação das nanopartículas metálicas (KIMILING *et al.*, 2006).

Para obter os núcleos de prata, a solução de nitrato de prata foi aquecida à 90°C sob intensa agitação e, em seguida adicionou-se rapidamente a solução redutora de citrato de sódio, de acordo com o que foi estabelecido no protocolo apresentado por Gorup *et al.* (GORUP *et al.*, 2011). Nesta etapa, ocorre um decaimento da concentração dos cátions metálicos solúveis (Ag^+), devido à produção de espécies químicas menos solúveis (Ag^0). Os átomos de prata reduzidos e coordenados por moléculas de água criam uma condição de supersaturação dos núcleos metálicos (BASTÚS *et al.*, 2014).

Nesta primeira etapa de transformação, os átomos tendem a apresentar uma diminuição de sua área superficial, em seguida, ocorre a nucleação em que os núcleos atômicos se agrupam em *clusters* e, posteriormente em partículas (Figura 14). Esse crescimento ocorre de modo constante até atingir a condição de equilíbrio, quando a prata em sua forma reduzida (Ag^0) é consumida e tem sua concentração reduzida em relação as condições de supersaturação (GAO, 2004).

Figura 14 - Esquema representativo do processo de síntese de nanopartículas de prata.



Fonte: AGNIHOTRI *et al.*, 2014 (Adaptado).

Ao elevar a concentração das partículas coloidais, aumenta-se a probabilidade de ocorrência de choque efetivo e aglomeração entre elas, uma vez que apresentam

interações intermoleculares de atração, como forças de van der *Waals*, que podem afetar a estabilidade do sistema (AGNIHOTRI *et al.*, 2014).

Portanto, a utilização de métodos de estabilização eletrostática ou o uso de mecanismos de estabilização estérea torna-se crucial para manter o equilíbrio do sistema e, permitir então, a estabilidade dos colóides (LAIDLER, 1993; EASTOE; HOLLAMBY; HUDSON, 2006; MEKHALIF *et al.*, 2008).

Durante a síntese das nanopartículas de prata, a estabilização dos colóides acontece por meio da repulsão eletrostática gerada pelo agente redutor utilizado, em que as forças atrativas entre as partículas são superadas devido a presença de cargas negativas na superfície das nanopartículas proveniente do citrato de sódio (EL-BADAWY; SCHECKEL; SUIDAN, 2012).

Com a adição do citrato de sódio à solução de nitrato de prata, iniciou-se a reação de redução e, assim, a contagem do tempo de reação foi iniciada. Em um primeiro momento, a preparação da suspensão coloidal de prata foi fundamentada em uma adaptação do protocolo estabelecido por Gorup *et al.* (GORUP *et al.*, 2011).

Em um primeiro teste (síntese 1), no momento em que a suspensão incolor tornou-se amarelada foram adicionados 200 µL da solução aquosa de hidróxido de amônio 8,4% para impedir que os núcleos remanescentes formados promovam a aglomeração das AgNPs. Desse modo, tal reagente age na estabilização da suspensão coloidal, promovendo a moderação da cinética de crescimento das partículas. O que permite então, a estocagem das AgNPs por um período de tempo maior sem a formação de corpo de fundo (GORUP *et al.*, 2011).

Em um segundo momento, uma nova síntese (síntese 2) foi realizada utilizando o protocolo estabelecido por Gorup *et al.* (GORUP *et al.*, 2011). Neste teste, modificou-se a concentração e o volume utilizado de hidróxido de amônio. Desse modo, após a mudança de coloração da suspensão coloidal foram adicionados 1 mL da solução aquosa de hidróxido de amônio 30%.

Após essa etapa, em ambos os testes realizados, a reação foi interrompida e resfriada à temperatura ambiente para posteriormente ser armazenada à 4 °C, ao abrigo da luz.

Em ambas as sínteses foi estabelecido um tempo de reação em torno de 12 min. Após esse tempo, a continuação da reação promovia a produção de uma coloração alaranjada na suspensão, o que indica a aglomeração dos colóides (POPA *et al.*, 2007).

Todos os reagentes e solventes foram utilizados como recebidos e, as soluções foram preparadas em água deionizada (Tabela 3).

Tabela 3 - Reagentes utilizados para a síntese de AgNPs.

Reagente	Pureza	Volume usado	Concentração usada	Origem
<i>Nitrato de prata, AgNO₃</i>	99%	100 mL	1 mmol/L	Labsynth, Diadema, São Paulo
<i>Citrato de Sódio, C₆H₅O₇Na₃</i>	99%	1 mL	0,3 mol/L	Labsynth, Diadema, São Paulo
<i>Hidróxido de amônio, 28% (solução aquosa)</i>	8,4%	200 µL	—————	Mallinckodt, México
<i>Hidróxido de amônio 30% (solução aquosa)</i>	30%	1 mL	—————	Mallinckodt, México

Fonte: DO AUTOR.

4.1.3 Imobilização dos oligonucleotídeos complementares (Oligo-miRs²²) nas nanopartículas de prata

A etapa de imobilização de biomoléculas consiste em ancorá-las na superfície das AgNPs produzidas nas duas sínteses. Para esse processo, não foi necessária a modificação química da superfície dos colóides, visto que a presença do grupo ditiol na forma de DTPA (Dithiol phosphoramidite) na extremidade 5' dos oligo-miRs possibilitou uma interação direta.

Tal interação é decorrente da alta afinidade entre o grupamento tiol e a prata, permitindo a sua adesão na superfície da partícula metálica por meio de ligações covalentes (LI *et al.*, 2013).

Neste trabalho foram realizados três tratamentos para a imobilização dos oligo-miRs (oligo-miR-203 e oligo-miR-205) nas AgNPs.

Para a seleção dos tratamentos alguns aspectos foram considerados:

- (1) Atração mútua entre as AgNPs e o grupo ditiol presente nos oligo-miRs;

²² Oligonucleotídeo complementar aos microRNAs específicos.

- (2) Repulsão eletrostática entre a carga negativa da monocamada de citrato formada na superfície das AgNPs e a carga negativa do grupamento fosfato dos oligo-miRs e,
- (3) Inatividade do grupamento ditiol em se acoplar na superfície das AgNPs.

4.1.3.1 Tratamento 1: Imobilização espontânea entre os oligo-miRs tiolados e as AgNPs

Nesse primeiro tratamento, considerando a atração mútua entre as nanopartículas metálicas e o grupo ditiol presente nos oligo-miRs, assumiu que o contato entre as amostras promoveria uma reação de adsorção química espontânea (KAUSAITE-MINKSTIMIENE *et al.*, 2010; PUTZBACH; RONKAINEN, 2013).

Considerando então, a disponibilidade dos materiais de trabalho, incluindo volume total e a concentração da solução estoque das amostras de oligo-miRs, a metodologia foi fundamentada na adaptação de diferentes protocolos disponíveis na literatura.

Para escolha da concentração de (1 μM) do oligo-miR-203 e oligo-miR-205 utilizou-se o protocolo proposto por Tan *et al.*, uma vez que a concentração está na mesma escala de molaridade (μM) com as amostras comerciais estudadas (TAN *et al.*, 2016). Já para selecionar o volume de oligo-miRs e AgNPs utilizou a proporção 1:200, respectivamente, como foi proposto por Arunrut *et al.* (ARUNRUT *et al.*, 2016).

Desse modo, o protocolo desenvolvido consistiu em adicionar 30 μL do oligo-miR-203 em 6 mL de AgNPs. Em seguida, a misturas foi agitada de forma branda e mantida em temperatura ambiente por 16h (LO *et al.*, 2013). Repetiu-se o mesmo procedimento com o oligo-miR-205. Após esse tempo, as nanopartículas metálicas modificadas com os oligo-miRs foram armazenadas à 4 °C ao abrigo de luz.

4.1.3.2 Tratamento 2: O efeito do pH ácido na imobilização de oligo-miRs tiolados em nanopartículas de prata

No segundo tratamento foi considerada a probabilidade da ocorrência de uma repulsão eletrostática entre as AgNPs e os oligo-miRs, uma vez que ambos são carregados negativamente. No caso das nanopartículas metálicas, a presença dessas cargas negativas é resultante de uma estabilização eletrostática realizada pelo citrato de sódio durante a

etapa de redução química na síntese. Em relação aos oligo-miRs, estas são provenientes do grupamento fosfato (DEKA *et al.*, 2015).

Para solucionar esse fator limitante da imobilização entre os oligo-miRs tiolados e as nanopartículas foi feita uma redução do pH da solução coloidal de prata, visto que ao tornar esta solução ácida ocorre uma diminuição da densidade de cargas negativas ao redor das AgNPs, facilitando o acoplamento dos oligo-miRs em sua superfície (ZARPELON, 2013).

Desse modo, a fim de avaliar o efeito do pH sobre as nanopartículas, repetiu-se o protocolo de imobilização citado no tratamento 1, porém após a síntese das nanopartículas modificou-se o seu pH de aproximadamente 9,0 para 4,0 utilizando uma solução de HCl com concentração de 0,01 mol/L.

4.1.3.3 Tratamento 3: Redução química da molécula de DTPA para ativação do grupamento ditiol

Neste tratamento, para a imobilização dos oligo-miRs na superfície das AgNPs, realizou-se uma nova investigação fundamentada na literatura com o intuito de selecionar parâmetros adequados para o estabelecimento de um novo protocolo de imobilização que promova a redução química do grupamento ditiol (DTPA) presente na extremidade 5' do oligo-miR-203 e oligo-miR-205.

A redução da molécula DTPA é necessária para a ativação dos dois grupamentos tióis presentes nos oligo-miRs e, permitir o seu acoplamento às superfícies metálicas (“Thiol SS Dipod Oligo Modifications from Gene LinK”, [s.d.]).

A tabela 4 mostra os parâmetros selecionados da comunidade científica para a construção desse protocolo e as referências correspondentes à cada um deles.

Tabela 4 - Parâmetros selecionados para a construção do protocolo de imobilização seguido de redução química do grupamento ditiol presente nos oligo-miRs.

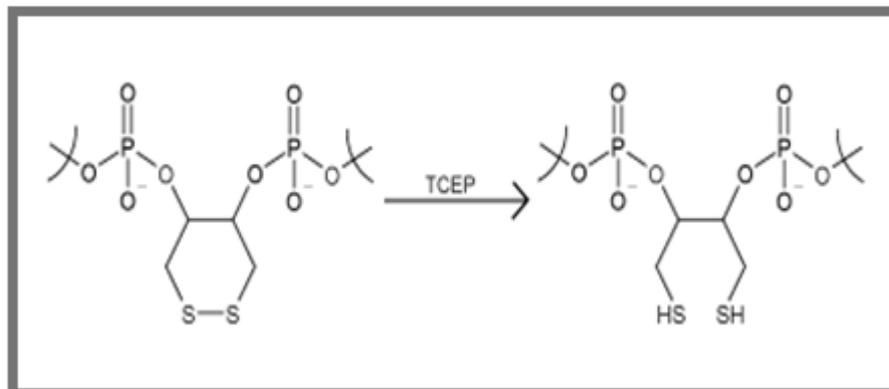
Parâmetros		Referência
REDUÇÃO DO DITIOL (DTPA)		
Concentração dos oligo-miRs	1 μ M	(TAN <i>et al.</i> , 2016)
Temperatura de trabalho	Ambiente	(HONG <i>et al.</i> , 2016)
Agente redutor	TCEP	(HEO <i>et al.</i> , 2013; YU; CHEN, 2015)
Proporção da concentração entre o redutor e oligo-miRs	1:10	(YOU <i>et al.</i> , 2017)
Volume do redutor	3 μ L	(YOU <i>et al.</i> , 2017)
Volume dos oligo-miRs	18 μ L	(YOU <i>et al.</i> , 2017)
IMOBILIZAÇÃO		
Volume de AgNPs	3 mL	(YOU <i>et al.</i> , 2017)
Volume de oligo-miRs final após a redução do ditiol	21 μ L (3 μ L do redutor +18 μ L do oligo)	(YOU <i>et al.</i> , 2017)
Tempo de incubação	16h	(LO <i>et al.</i> , 2013)
Temperatura de incubação	Ambiente	(HEO <i>et al.</i> , 2013)

Fonte: DO AUTOR.

Feita a adaptação necessária para a construção do protocolo, os materiais foram preparados. Em resumo, 3 μ L da solução de TCEP (Tris 2-carboxyethyl-phosphine hydroxichloride) com concentração 10 μ M foram adicionados em 18 μ L do oligo-miR-203 com concentração igual à 1 μ M. Tal procedimento foi repetido com o oligo-miR-205.

Após essa etapa, as amostras foram agitadas por 1h em temperatura ambiente. É esperado com este procedimento, a liberação de dois grupamentos tióis provenientes da redução do ditiol ligado aos oligo-miRs para um possível acoplamento estável à superfície das AgNPs (Figura 15) (LIEPOLD *et al.*, 2008).

Figura 15 - O esquema da redução da molécula de DTPA liberando dois grupamentos tióis para ancorar em superfícies metálicas.



Fonte: “Dithiol linker”- Trilink Biotechnologies [2018].

Após a etapa de redução, os oligo-miRs foram adicionados à 3 mL da suspensão coloidal de prata e, mantidos em repouso por 16h à temperatura ambiente.

O armazenamento das AgNPs modificadas com os oligo-miRs foi feito à 4 °C ao abrigo de luz.

4.2 DETECÇÃO DOS MICRORNAS: ETAPA DE SENSORIAMENTO

4.2.1 Hibridização do conjugado AgNPs-oligo-miR e o seu alvo específico (microRNA)

4.2.1.1 Condições fixas de tempo (10 min) e temperatura de reação (70°C)

A etapa de hibridização consiste em uma reação de anelamento espontânea entre uma sequência alvo desnaturada e um pequeno fragmento de fita simples de DNA ou RNA complementar para a formação de um híbrido estável (SWINGER; TUCKER, 1996).

Neste estudo, o híbrido formado deriva de uma interação entre sequências complementares de DNA (oligo-miRs) ancorados à superfície das AgNPs e microRNAs.

Inicialmente, a metodologia utilizada para a interação entre o conjugado AgNP-oligo-miRs e os microRNAs específicos foi fundamentada em uma adaptação do protocolo proposto por Borghei *et al.* (BORGHEI *et al.*, 2015).

Foram adicionados 18 μL do miR-203 com a mesma concentração descrita acima para o oligo-miR-203 (1 μM). A mistura foi agitada e incubada por 15 min. Em seguida, esta foi aquecida e mantida à 70 °C por 10 min sob agitação. Esse procedimento foi repetido para o miR-205 (BORGHEI *et al.*, 2015).

A escolha da temperatura não foi empírica, uma vez que a Temperatura de Melting (TM) do miR-203 (50, 9°C) e miR-205 (58,6°C) tem influência sobre a eficiência do reconhecimento dos alvos (NICASIO-COLLAZO *et al.*, 2014). Desse modo, o aquecimento à uma temperatura superior, no caso 70 °C, permite que as fitas dos microRNAs permaneçam livres para a possível interação com as nanopartículas modificadas.

Após o aquecimento, as amostras foram mantidas em repouso por 50 min até atingir a temperatura ideal (abaixo da Temperatura de Melting) para a formação do duplex (MACDONALD; JERRIS; BENNET, 2018).

4.2.2 Otimização dos parâmetros do sensor

4.2.2.1 Condições variadas de tempo e temperatura de reação

4.2.2.1.1 Investigação da temperatura de aquecimento

Para a ocorrência da hibridização, como já citado anteriormente, é preciso garantir a dissociação total dos microRNAs para a possível interação com o oligo-miR específico (NEVES; GUEDES, 2012). Desse modo, a investigação da temperatura de dissociação para cada microRNA torna-se necessária para distinguir a condição ideal de cada sequência estudada (BECKER, 2012).

Para este teste então, repetiu-se a metodologia de hibridização citada no item 4.2.1.1, porém substituindo a temperatura de 70°C pelas seguintes temperaturas descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Temperatura para o aquecimento da suspensão coloidal com o conjugado AgNP-oligo-miRs contendo amostras de microRNAs durante o processo de hibridização.

miR-203	miR-205
53°C	61°C
55°C	63°C
57°C	65°C
59°C	67°C
61°C	69°C

Fonte: DO AUTOR.

Para selecionar as temperaturas de aquecimento, conhecer os valores da T_M de cada microRNA foi fundamental nesse estudo. Sabendo-se que para o miR-203 a T_M é igual a 50,9 °C e para o miR-205 essa é igual à 58,6 °C buscou-se construir uma curva de temperatura de dissociação com 5 pontos para cada amostra variando de 2 em 2 °C.

Tal escolha foi fundamentada no fato de que a variação entre 2 a 10 °C acima da temperatura de Melting não afetaria a estabilidade dos microRNAs (SILAHTAROGLU *et al.*, 2007).

4.2.2.1.2 Investigação do tempo de aquecimento

Para investigar o efeito do aquecimento durante a etapa de hibridização, o protocolo proposto no item 4.2.1.1 teve a substituição do tempo 10 min por diferentes intervalos de tempo. Desse modo, para este teste, as AgNPs modificadas em contato com os microRNAs-alvos foram aquecidas em intervalos variados entre 1 a 10 min.

4.3 CONTROLE NEGATIVO

Para a avaliação da especificidade no estudo do reconhecimento de microRNAs utilizando o conjugado AgNP-oligo-miRs, o protocolo de hibridização preliminar e em condições ideais foi repetido, porém substituindo o miR-203 e miR-205 (específicos) por água Mili-Q num primeiro teste de controle e, em um segundo teste, foi feita a hibridização dos oligo-miRs com os alvos não específicos (oligo-miR-203 com miR-205 e oligo-miR-205 com miR-203).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Com a finalidade de avaliar morfológicamente as AgNPs, validar os protocolos de síntese, de imobilização de biomoléculas e a hibridização do complexo formado entre as AgNPs modificadas e o seu alvo específico e ainda, estudar uma proposta de sensoriamento óptico com as AgNPs realizou-se a sua caracterização por meio das técnicas de Microscopia de Força Atômica (AFM), Espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) e Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

É válido ressaltar que todos os ensaios de caracterização foram realizados em triplicata.

4.4.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As análises de microscopia de força atômica foram realizadas no microscópio Solver Nano - NT MDT com o intuito de caracterizar morfológicamente as nanopartículas metálicas produzidas.

Além disso, a obtenção de imagens no modo contato intermitente “*tapping mode*” permitiu estimar o diâmetro dessas partículas. Para tais análises, o preparo da amostra consistiu na deposição de 50 μL de AgNPs diluídas em água deionizada em uma proporção de 1:10 sobre a superfície de mica muscovica quadrada de dimensão 15x15 mm (Ted Pella Inc, Redding, Califórnia, USA), previamente clivada com fita adesiva e esterilizada no equipamento de emissão luz ultravioleta e ozônio ProCleaner™, modelo UV.PC.220 Plus (BIOFORCE Nanosciences, Ames, Iowa, USA).

Para a secagem da suspensão sobre a superfície da mica, estas foram armazenadas em um dessecador por 24h. Em seguida, a mica totalmente seca foi fixada em um suporte magnético com fita dupla-face para a obtenção das imagens do filme produzido.

As imagens foram obtidas utilizando as pontas de AFM de nitreto de silício, modelo AN-NSG3, NT-MDT (raio $\sim 10\text{nm}$ e frequência de ressonância igual à 90kHz). E para a sua caracterização topográfica e tratamento utilizou os softwares da Nova-Px 3.2.5 – ND-MDT, ImageJ® disponível gratuitamente via internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) e para as análises estatísticas o software Origin® 8.0.

4.4.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

Essa técnica foi aplicada para investigar os grupos químicos envolvidos nas ligações das moléculas após a etapa de imobilização dos oligo-miRs e a sua interação com o alvo específico.

A preparação dos filmes foi feita em placas de monocristais de silício dopado tipo n, limpas previamente com acetona para evitar possíveis contaminações por resíduos lipídicos.

Foram preparados três filmes para cada amostra: o primeiro contendo somente as AgNPs, o segundo as AgNPs imobilizadas com os oligo-miRs e a terceira placa contendo o complexo formado entre as AgNPs modificadas e os microRNAs específicos.

Após a deposição de 20 camadas de cada amostra, estas foram mantidas em um dessecador até a secagem total. É válido ressaltar que para cada camada realizada utilizou-se de 40 μL das amostras.

Os espectros foram obtidos em um equipamento da Thermo Scientific Nicolet™ IR 200, em um intervalo espectral de 4000 e 400 cm^{-1} , com 256 varreduras de 16 cm^{-1} .

4.4.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

A espectrofotometria na região ultravioleta-visível foi aplicada para caracterizar as propriedades ópticas das nanopartículas de prata. Desse modo, o emprego da técnica envolveu desde acompanhamento da síntese até o processo de interação com os microRNAs.

As leituras de absorção foram realizadas em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-Vis-NIR 3600) na região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético (200-800 nm) em um intervalo de leitura de 0,1 nm. Os resultados obtidos foram analisados por intermédio de investigações gráficas e métodos estatísticos disponíveis pelo software Origin® 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

5.1.1 Síntese e propriedades das nanopartículas de prata

5.1.1.1 Formação de AgNPs

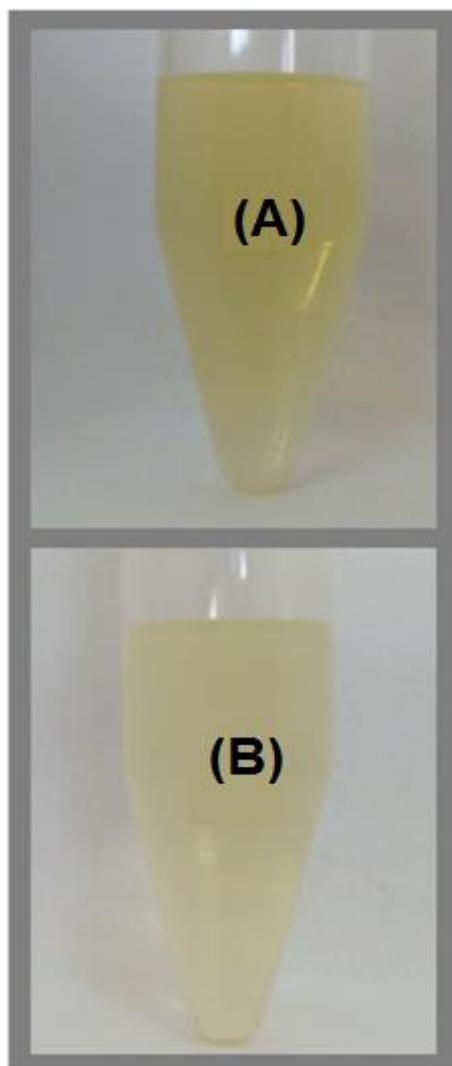
O estudo da estrutura cristalina das AgNPs formadas após os processos de síntese é fundamental para compreender suas propriedades físico-químicas e, poder delinear protocolos de imobilização com biomoléculas específicas para a detecção de diversas patologias, dentre elas a neoplasia maligna de cabeça e pescoço (ROSI; MIRKIN, 2005; LIN *et al.*, 2014).

O controle de tais propriedades está diretamente associado ao tamanho e à morfologia das nanopartículas. Além disso, a composição e distribuição apresentam grande relevância na determinação da biocompatibilidade e posterior aplicação desses dispositivos no sensoriamento de microRNAs durante o diagnóstico das neoplasias malignas (MOCK *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2016).

Durante a etapa de síntese, a determinação de uma condição ideal de temperatura e tempo de reação é primordial para a obtenção de nanopartículas que exibam formatos e distribuição homogênea (PILLAI; KAMAT, 2004). Neste trabalho, a temperatura da solução foi mantida em 90 °C e a reação finalizada aproximadamente 12 min após a adição do agente redutor (citrato de sódio), como estabelecido pelo protocolo descrito na metodologia (GORUP *et al.*, 2011).

Como resultado, em ambas as sínteses realizadas (síntese 1 e 2), obteve-se a formação de uma suspensão homogênea de coloração amarela (Figura 16- A e B), fato que evidenciou a formação de AgNPs, uma vez que tal resultado é considerado um parâmetro de referência de produção dessas nanopartículas (GORUP *et al.*, 2010).

Figura 16 - Suspensão coloidal de AgNPs. (A) Síntese 1 em que foi utilizado 200 μ L de hidróxido de amônio (8,4%). (B) Síntese 2 em que foi utilizado 1 mL de hidróxido de amônio (30%).



Além disso, essa coloração amarela perceptível nas suspensões coloidais de AgNPs e ausente na prata em sua forma sólida é uma característica proveniente do fenômeno de absorbância plasmônica de superfície (LINK; EL-SAYED, 1999).

No processo investigativo, pode-se perceber que tal fenômeno é responsável por promover a oscilação coletiva dos elétrons de condução na superfície dessas partículas nanométricas quando a luz eletromagnética incidente é absorvida, fazendo-as apresentar um pico de absorção bastante singular (MOCK *et al.*, 2002).

No estudo em questão, com a aplicação da técnica espectroscopia na região UV-Vis foi possível visualizar uma única banda de absorção máxima na faixa espectral de 421-435 nm para as AgNPs produzidas na síntese 1 e uma única banda de absorção máxima na faixa espectral de 408-424 nm para as AgNPs produzidas na síntese 2. Ambos os picos apresentaram-se na forma de gaussiana (Figura 17).

De acordo com Gorup *et al.* (2010) e Ballottin (2014), a produção de um pico de absorção na faixa espectral entre 400 e 670 nm e, a presença de uma única banda plasmônica no formato de gaussiana indica a produção de AgNPs esféricas (MARZÁN, 2004; PODLIPENSKY *et al.*, 2005; GORUP *et al.*, 2010).

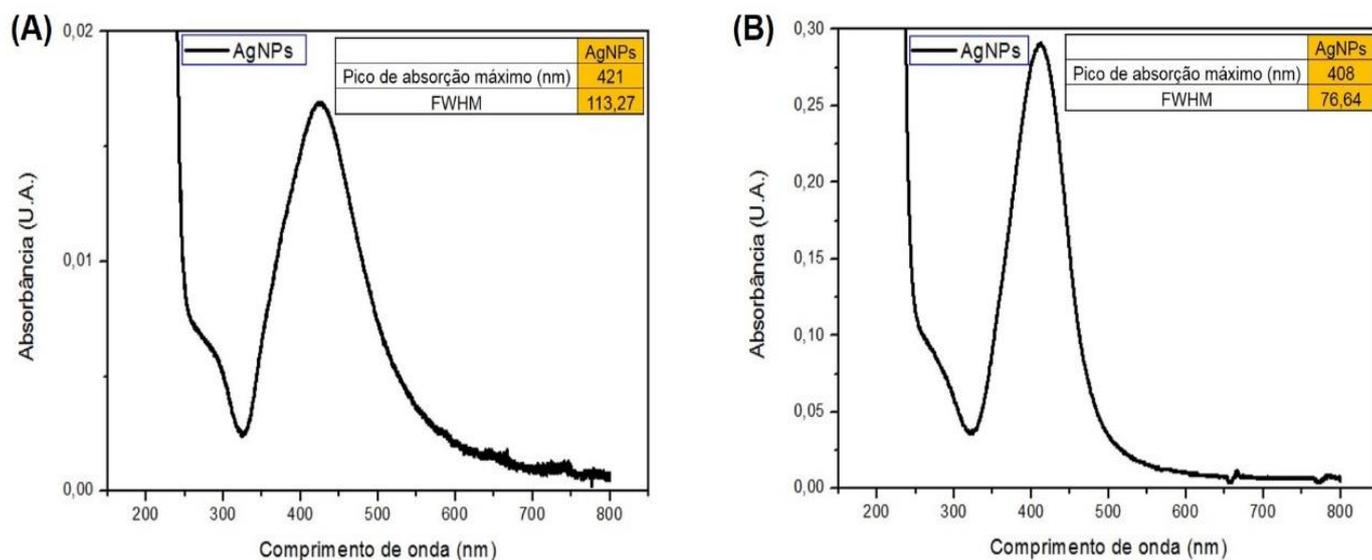
Ademais, Garcia (2011) e Solomon *et al.* (2007) mostraram que o comprimento de onda máximo decorrente dessa absorbância plasmônica pode ser utilizado para estimar o tamanho das partículas produzidas (Tabela 6) (GARCIA, 2011; SOLOMON *et al.*, 2007).

Tabela 6 - Correlação de tamanhos de AgNPs e comprimento de onda na análise por UV-Vis.

Tamanho da partícula (nm)	Comprimento de onda (nm)
5-10	380-390
10-14	395-405
35-50	420-435
60-80	438-450

Fonte: GARCIA, 2011.

Figura 17 - Espectro de absorbância plasmônica no UV-Vis das AgNPs. (A) Síntese 1, (B) Síntese 2.



Com base na tabela 6 e nos dados espectrais, pode-se inferir que as AgNPs apresentam um tamanho máximo de aproximadamente 50 nm. Sendo as AgNPs produzidas na síntese 2 menores, quando comparada às nanopartículas produzidas na síntese 1, devido a sua banda de absorção estar situada em comprimentos de onda menores (SOLOMON *et al.*, 2007; GARCIA, 2011; JÚNIOR *et al.*, 2012).

5.1.1.2 Determinação da concentração de AgNPs

A partir dos resultados de caracterização por UV-Vis (Figura 17-A e B), mais especificamente, em relação aos valores de absorção de cada síntese, foi possível determinar a concentração de AgNPs presentes nas suspensões coloidais de cada síntese.

Para calcular a quantidade de partículas, utilizou-se a equação de Lambert-Beer:

$$c = A/\epsilon$$

onde, c é a concentração em mol/L, A é a absorção máxima das partículas e ϵ o coeficiente de absorvidade molar (PARAMELLE *et al.*, 2014).

O coeficiente de absorvidade molar é caracterizado como a capacidade de uma substância em absorver a radiação eletromagnética em determinada frequência. Em se tratando de nanopartículas, a absorvidade molar está associada ao diâmetro das partículas, porém fatores como comprimento de onda, solvente e temperatura também age sob este parâmetro (PARAMELLE *et al.*, 2014).

Para obter o valor de ϵ então, foi utilizada uma tabela construída para AgNPs esféricas de tamanho entre 8 e 100 nm. Essa tabela permite estimar de forma rápida e fácil a concentração das partículas em suspensão a partir do espectro óptico da amostra que está sendo investigada (PARAMELLE *et al.*, 2014).

A tabela 7 mostra a relação entre comprimento de onda, diâmetro e o coeficiente de absorvidade molar de AgNPs monodispersas (PARAMELLE *et al.*, 2014).

Tabela 7 - Dados para determinar a concentração molar AgNPs esféricas usando espectros de UV- Vis. d é o diâmetro, λ é comprimento de onda e ϵ é o coeficiente de absortividade molar das partículas.

d / nm	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \cdot 10^8$	d / nm	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \cdot 10^8$
8	392.0*	1.84	56	427.0	658
10	392.1*	5.56	58	429.2	699
12	395.2*	10.1	60	431.5	739
14	397.2*	15.8	62	433.8	779
16	398.5*	22.7	64	436.2	820
18	399.7*	31.3	66	438.7	860
20	400.8	41.8	68	441.3	900
22	401.6	54.8	70	443.8	941
24	402.5	70.8	72	446.7	981
26	403.5	90.5	74	449.5	1021
28	404.5	115	76	452.3	1062
30	405.6	145	78	455.3	1102
32	406.8	181	80	458.3	1142
34	408.1	215	82	461.4	1183
36	409.4	255	84	464.6	1223
38	410.8	295	86	467.9	1263
40	412.3	336	88	471.2	1304
42	413.9	376	90	474.6	1344
44	415.5	416	92	478.1	1384
46	417.3	457	94	481.6	1425
48	419.1	497	96	485.3	1465
50	420.9	537	98	489.0	1505
52	422.9	578	100	492.8	1546
54	424.9	618			

Fonte: PARAMELLE *et al.*, 2014.

Com os dados espectrais da síntese 1 e 2 (Figura 17-A e B respectivamente) e os valores de ϵ disponíveis na tabela 7 foi possível determinar a concentração molar das AgNPs produzidas em cada síntese.

Para a síntese 1, sendo $A = 0,018$ e $\epsilon = 537 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, substituindo os valores na equação de Lambert-Beer obteve-se que:

$$c = A/\epsilon$$

$$c = 0,018/537 \times 10^8 = \underline{3,35 \times 10^{-13} \text{M}}$$

Para a síntese 2, sendo $A = 0,28$ e $\epsilon = 215 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, substituindo os valores na equação obteve-se que:

$$c = A/\epsilon$$

$$c = 0,28/215 \times 10^8 = \underline{1,3 \times 10^{-11} \text{M}}$$

De acordo com pesquisadores, a quantidade de luz absorvida por uma amostra é diretamente proporcional a sua concentração (PEREIRA; CRESPILO, 2010). Sabendo que o valor da absorvância foi menor para as partículas da síntese 1, os resultados alcançados com essa análise corroboram tal afirmação, uma vez que com os cálculos, obteve-se que a síntese 1 produziu um menor número de partículas em relação a síntese 2.

Tal diferença de concentração, em ambas as sínteses, pode estar associada ao processo de produção de AgNPs. Madras e McCoy (2001) afirmou que, o processo de produção de AgNPs maiores pode resultar no consumo de partículas menores, afetando diretamente o tamanho e a concentração final das nanopartículas em suspensão (MADRAS; MCCOY, 2001).

Além disso, o controle de algumas variáveis durante a síntese como, por exemplo, a molaridade de reagentes é também essencial na determinação da concentração de AgNPs (PILLAI; KAMAT, 2004).

Desse modo, sabendo que os estudos apontam que a síntese 1 originou partículas maiores e, que ainda foram utilizados um volume e uma concentração diferenciada de hidróxido de amônio em ambas as sínteses, os resultados referentes a produção de partículas apresentados acima podem ser justificados pelas afirmações feitas por Madras e McCoy (2001) e Pillai e Kamat (2004) (MADRAS; MCCOY, 2001; PILLAI; KAMAT, 2004).

5.1.1.3 Determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas

(a) Determinação da largura total à meia altura (FWHM) utilizando UV-Vis

Com a aplicação de análises estatísticas nos espectros de absorção obtidos em cada síntese foi possível determinar a largura total à meia altura (FWHM, do inglês *Full Width Half Maximum*) (Figura 17-A e B).

O valor de fwhm é bastante útil para classificar a distribuição de tamanho das AgNPs em suspensão. De acordo com estudos, quanto maior é o valor atribuído ao fwhm, mais amplo será o pico e, conseqüentemente, as partículas sintetizadas apresentará uma menor uniformidade de tamanho (SILEIKAITE *et al.*, 2009).

Após a realização de análises estatísticas nos espectros de absorção, verificou-se que as AgNPs produzidas na síntese 1 apresentaram um valor de fwhm igual à 113,27

(Figura 17-A), já as AgNPs produzidas na síntese 2 o valor de fwhm foi igual à 76,64 (Figura 17-B). Isso mostra que a síntese 1 apresentou uma menor homogeneidade na distribuição das partículas em suspensão.

(b) Microscopia da força atômica (AFM)

Para validar as hipóteses teóricas apresentadas no item 5.1.1.1 e 5.1.1.3-a referentes ao tamanho, formato e distribuição das nanopartículas, as AgNPs sintetizadas foram submetidas à uma investigação morfológica mais aprofundada. A técnica de AFM, em modo intermitente, foi empregada nessa análise.

Essa é uma técnica que apresenta grande versatilidade, sendo o modo intermitente a operação mais adequada para analisar e obter imagens de nanopartículas. Neste modo de operação, a oscilação da haste trabalha num comando repulsivo, impedindo que durante a varredura a ponta danifique a amostra, visto que o seu contato não é contínuo e as forças laterais que operam entre a ponta e a amostra, no modo contato, são eliminadas (BABIC *et al.*, 2016).

Assim, para analisar a topografia da amostra, o equipamento apresenta uma variação na amplitude, em resposta à oscilação que ocorre na haste quando a ponta detecta o alvo. A imagem obtida é proveniente de uma correlação entre a amplitude detectada, durante a interação da ponta com as AgNPs e o valor atribuído ao substrato limpo. A diferença, então, corresponde ao perfil topográfico das nanopartículas esféricas (BABIC *et al.*, 2016; ÜNER, 2016).

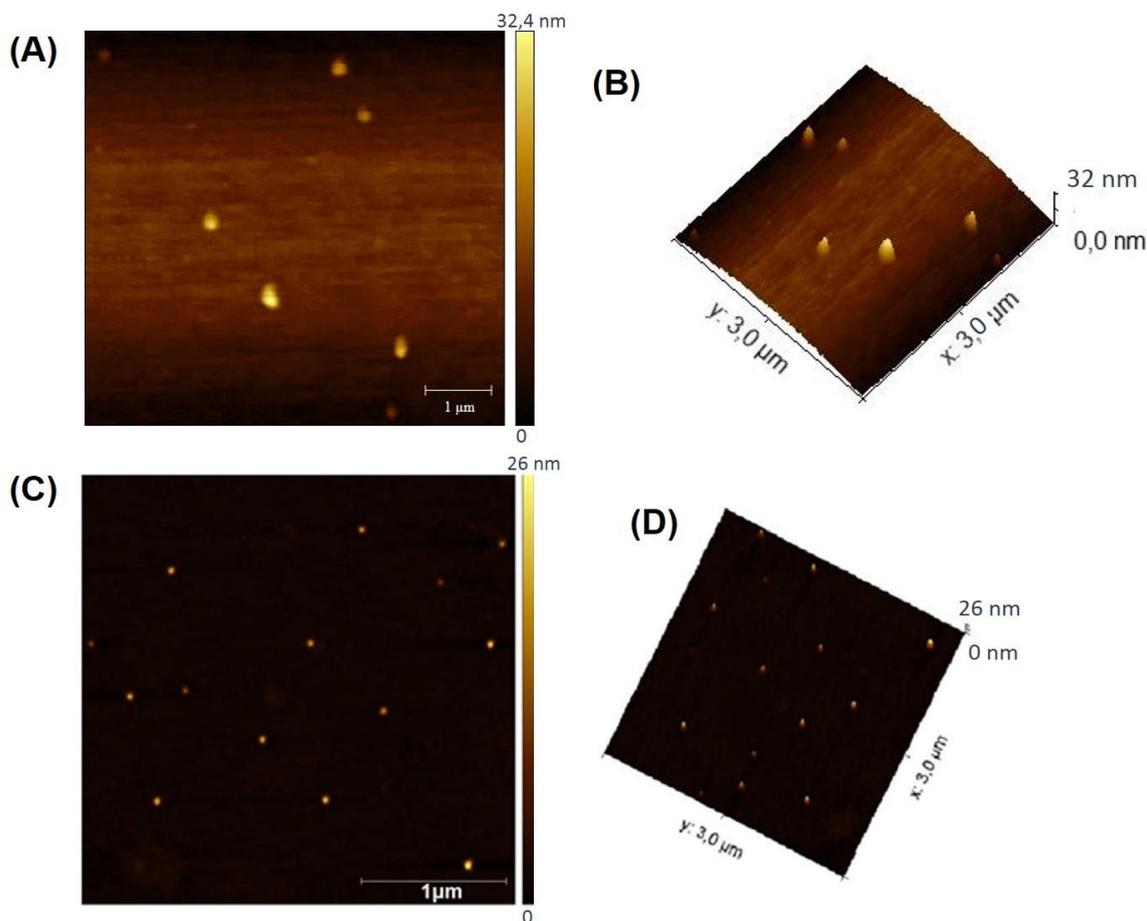
As figuras 18-A e C demonstram a formação de AgNPs esféricas em uma imagem bidimensional. A figura 18-A representa a imagem bidimensional da síntese 1, e a figura 18-C representa a imagem bidimensional da síntese 2.

Em relação a homogeneidade na distribuição de tamanho das partículas, a figura 18-C mostrou uma pequena variação nos tamanhos das AgNPs quando comparada as AgNPs da figura 18-A. Mesmo com essa pequena variação, o estudo demonstrou que o método de síntese utilizado foi eficaz na produção de nanopartículas uniformes (como será demonstrado a diante).

As figuras 18-B e D representam a imagem tridimensional das AgNPs produzidas na síntese 1 e 2, respectivamente.

Nas imagens foi possível enfatizar o formato esférico das partículas e ainda, com o estudo topográfico observou-se uma altura máxima de 32 nm para as AgNPs produzidas na síntese 1 e 26 nm para as AgNPs da síntese 2.

Figura 18 - Imagem das AgNPs obtidas por AFM em uma área de varredura de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$. (A) e (C) representam a altura bidimensional das AgNPs, sendo (A) referente à síntese 1 e (C) à síntese 2. (B) e (D) representam a altura tridimensional das AgNPs, sendo (B) referente à síntese 1 e (D) à síntese 2.



Todavia, uma investigação visual não é suficiente para caracterizar de forma precisa as amostras, visto que o processamento da imagem pode estar acompanhado de distorções ocasionadas pelo uso de filtros, que podem gerar ruídos na imagem, na forma de resultados incoerentes com o tamanho real das partículas analisadas (RODRIGUES, 2003).

Desse modo, assumir que a altura topográfica de cada imagem corresponde ao diâmetro das AgNPs produzidas, uma vez que as imagens revelaram nanopartículas com formato esférico, pode ser um equívoco (BABIC *et al.*, 2016; RODRIGUES, 2003).

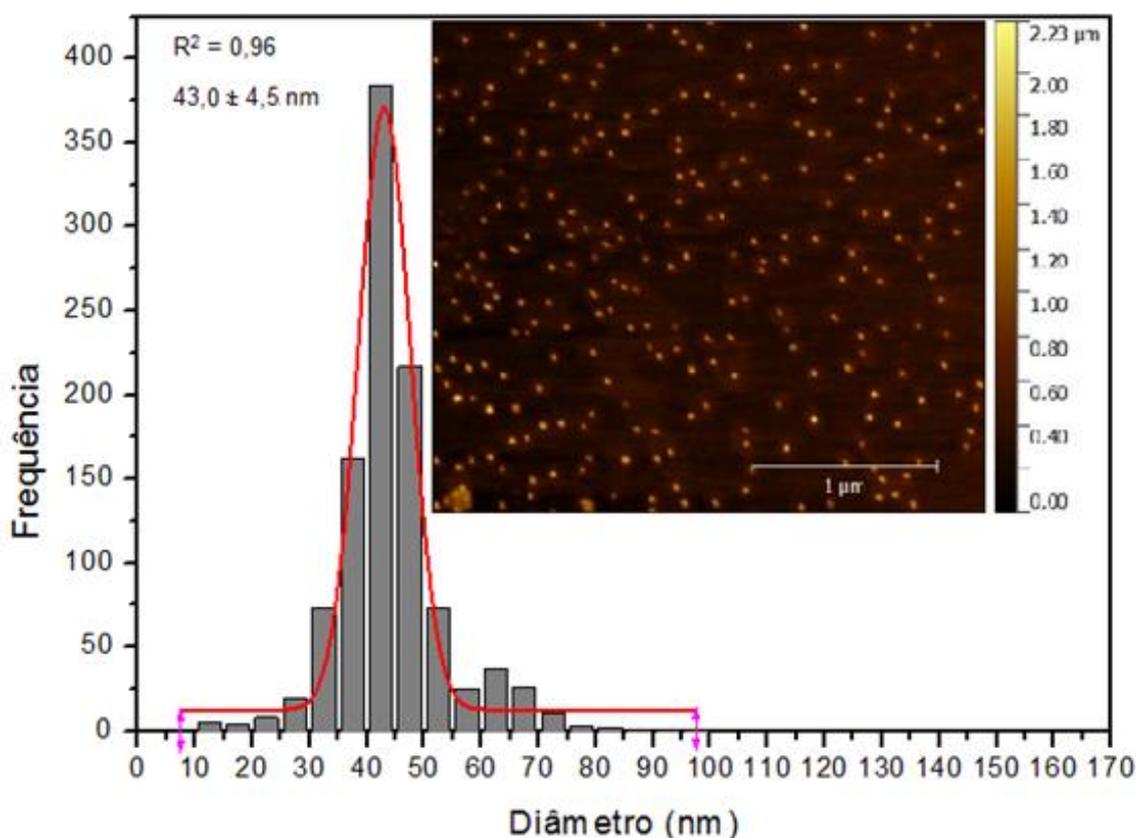
Para minimizar os erros em análises de imagens, foram empregados *softwares* de análise de dados e estatística para calcular o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersividade (PDI) (ANDRADE, 2013; COSTA, 2012; HANNICKEL, 2012).

Para essa investigação, as imagens utilizadas apresentaram uma área de representatividade maior de AgNPs (área de varredura de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$), a fim de evitar uma análise tendenciosa.

Após o tratamento realizado com o *software ImageJ*, foi possível obter o tamanho de cada partícula presente nas imagens. Esses dados foram convertidos em uma planilha e plotados no ORIGIN 8.0, para obter o diâmetro médio das AgNPs produzidas em ambas as sínteses.

Para síntese 1, a figura 19 apresenta o histograma elaborado com o diâmetro médio das nanopartículas presentes na suspensão. Este foi equivalente a $43,0 \pm 4,5 \text{ nm}$.

Figura 19 - Histograma de distribuição de tamanho de AgNPs esféricas da síntese 1 determinado a partir de uma imagem de AFM bidimensional de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$.



Para calcular o PDI dessa análise, os valores do diâmetro médio e desvio padrão foram aplicados na seguinte fórmula:

$$PDI = \frac{DP}{d}$$

onde, PDI é o índice de polidispersividade,

DP é o desvio padrão e

d é o diâmetro das nanopartículas.

Substituindo os valores:

$$DP = 4,5 \text{ nm}$$

$$d = 43,0 \text{ nm}$$

$$PDI = 4,5/43,0$$

$$PDI = 0,105 = 10,5\%$$

Para síntese 2, a figura 20 apresenta o histograma elaborado com o diâmetro médio das nanopartículas presentes na suspensão. Este foi equivalente a $24,9 \pm 2,4$ nm.

Para calcular o PDI da análise em questão, os valores do diâmetro médio e desvio padrão, apresentados no histograma da figura 20, foram aplicados na fórmula mencionada acima. Substituindo-se os valores, tem-se que:

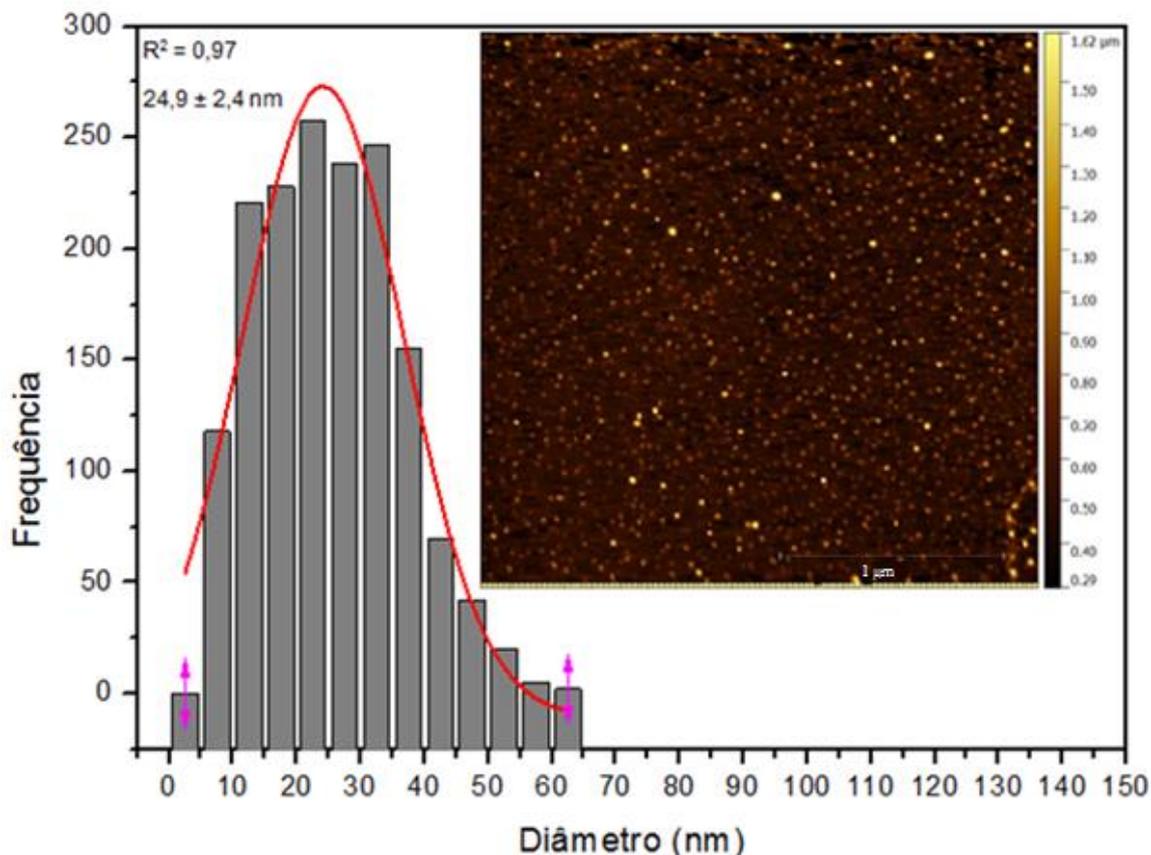
$$DP = 2,4 \text{ nm}$$

$$d = 24,9 \text{ nm}$$

$$PDI = 2,4/24,9$$

$$PDI = 0,097 = 9,7\%$$

Figura 20 - Histograma de distribuição de tamanho de AgNPs esféricas da síntese 2 determinado a partir de uma imagem de AFM bidimensional de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$.



Com essa análise, considerando então, os valores de absorvância plasmônica expressos na figura 17 e os dados obtidos com o tratamento da imagem, pode-se assumir que, em ambas as sínteses, o diâmetro das nanopartículas foi condizente aos valores apresentados na tabela 6 (GARCIA, 2011).

Além disso, foi possível averiguar, com os cálculos, informações relevantes a respeito do grau de uniformidade e homogeneidade das nanopartículas. De acordo com estudos são considerados aceitáveis $\text{PDI} < 0,7$ ou $\text{PDI} < 70\%$, visto que, quanto menor é o valor atribuído ao PDI maior será a uniformidade do diâmetro das AgNPs (COSTA, 2012).

Essa investigação confirmou juntamente ao valor de fwhm (item 5.1.1.3-a) que ambas as sínteses de AgNPs produziram partículas monodispersas, todavia, a síntese 2 foi mais eficiente nesse processo, gerando partículas com tamanhos e formatos mais homogêneos, uma vez que o PDI obtido foi menor quando comparado ao PDI das partículas obtidas na síntese 1.

No que se refere aos estudos biomédicos, a aplicação de AgNPs monodispersas é essencial para determinar e direcionar as propriedades físico-químicas das AgNPs em aplicações desejadas (LIN *et al.*, 2014).

Já aplicação tecnológica de nanopartículas polidispersas²³ pode ser desvantajosa, uma vez que a irregularidade nos tamanhos não permite que as nanopartículas exibam propriedades específicas, o que dificulta os procedimentos de imobilização de biomoléculas e, conseqüentemente, a sua aplicação em um sistema de biossensoriamento (JIANG *et al.*, 2004).

Todas essas características reveladas são úteis para delinear estratégias de imobilização de biomoléculas nas AgNPs produzidas e, permitir que estas possam ser aplicadas em estudos biomédicos. Todavia, estudos demonstram que AgNPs menores e mais uniformes (como observada na síntese 2) apresentam uma maior sensibilidade no reconhecimento de moléculas biológicas (HOO *et al.*, 2008). Desse modo, as partículas produzidas na síntese 2 podem ser mais adequadas na aplicação de métodos de detecção de microRNAs.

5.2 ESTABILIDADE DAS AgNPs

Para avaliar a estabilidade das AgNPs produzidas em ambas as sínteses, as amostras foram mantidas em condições iguais de temperatura (temperatura ambiente) e sob a exposição da luz durante 1 semana. A diferença de estabilidade das AgNPs pode ser observada na figura 21.

No primeiro caso, uma semana após a síntese, a suspensão já apresentava aglomeração, evidenciada pela mudança de coloração e pela formação de corpo de fundo na suspensão coloidal.

No segundo caso, uma semana após a síntese, a suspensão não apresentou uma mudança evidente em sua coloração, porém notou-se uma menor quantidade de precipitado quando comparada à suspensão da síntese 1, o que indica que o processo de aglomeração ocorreu de forma mais lenta nas AgNPs da síntese 2.

Tal resultado pode ser proveniente da diferença de volume e concentração de hidróxido de amônio utilizado nas sínteses, uma vez que esse reagente atua como

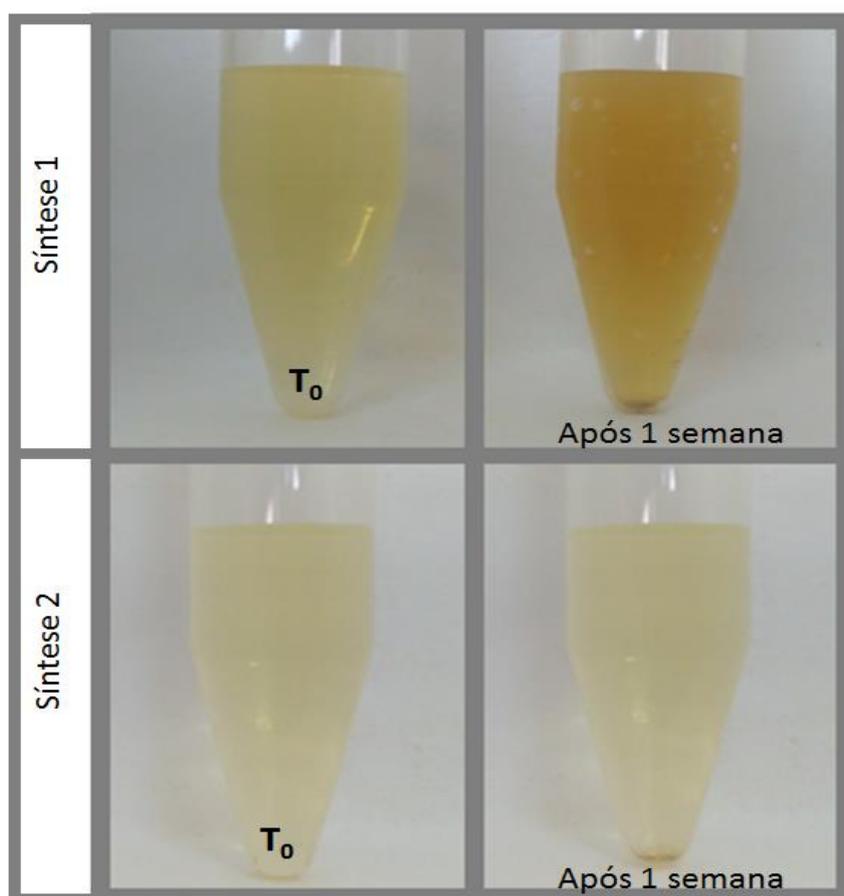
²³ Que apresentam tamanhos e formatos heterogêneos.

estabilizante e moderador da cinética de crescimento das partículas tanto sob aquecimento, quanto em temperatura ambiente (GORUP *et al.*, 2011).

Desse modo, a utilização de um volume e uma concentração menor de hidróxido de amônio pode não ter sido suficiente nesse processo permitindo, então, o crescimento das partículas e afetando a estabilidade do sistema quando estas são expostas à luz e à temperatura ambiente.

A partir desse resultado, a síntese 2 apresentou AgNPs mais estáveis, quando comparadas às AgNPs produzidas na síntese 1.

Figura 21 - Síntese de AgNPs pelo método do citrato com adição de hidróxido de amônio (8,4% - síntese 1) e (30% - síntese 2) sob condições ambiente.



5.3 IMOBILIZAÇÃO DAS AgNPs COM OS OLIGO-miRs

A etapa de imobilização consiste em uma modificação na camada superficial das AgNPs devido a ancoragem de biomoléculas. Essa ligação ocasiona uma alteração nas propriedades físico-químicas das AgNPs, reorganizando as partículas para o reconhecimento de moléculas específicas (YANG; VOSCH, 2015; NGHIEM *et al.*, 2010).

A dinâmica da alteração nas propriedades físico-químicas das AgNPs das sínteses 1 e 2, durante a etapa de imobilização, foi estudada por meio da técnica de espectrofotometria UV-Vis.

Essa técnica permite caracterizar as mudanças das propriedades ópticas das AgNPs ocasionadas pela adição de moléculas na superfície das nanopartículas (MAHMOUDI *et al.*, 2011; ROSARIN; MIRUNALINE, 2011).

Para a imobilização do oligo-miR-203 e oligo-miR-205 na superfície das AgNPs sintetizadas foram testados três tratamentos, como apresentado na metodologia.

O tratamento 1 e 2 não apresentou um resultado satisfatório na imobilização dos oligo-miRs.

No tratamento 1 não foi possível observar uma variação significativa nas propriedades ópticas das AgNPs após a adição dos oligo-miRs em ambas as sínteses, visto que a banda de absorção permaneceu igual ao espectro das AgNPs não modificadas (Apêndice A). Já no tratamento 2, a mudança de pH da suspensão coloidal promoveu a aglomeração total do sistema impedindo a realização da etapa de imobilização (Apêndice B).

Desse modo, somente o tratamento 3 apresentou resultados satisfatórios na construção de um biossensor de detecção de microRNAs específicos para o CECP, como será apresentado a seguir.

5.3.1 Redução química da molécula de DTPA para ativação do grupamento ditiol (Tratamento 3)

De acordo com estudos, o DTPA, ou seja, o ligante de ditiol inserido na extremidade 5' dos oligo-miRs é fornecido comercialmente em sua forma oxidada (dissulfeto). Desse modo, foi preciso reduzir a ligação dissulfeto com agentes redutores específicos para gerar a sua forma ativa e permitir que o oligo-miR-203 e oligo-miR-205

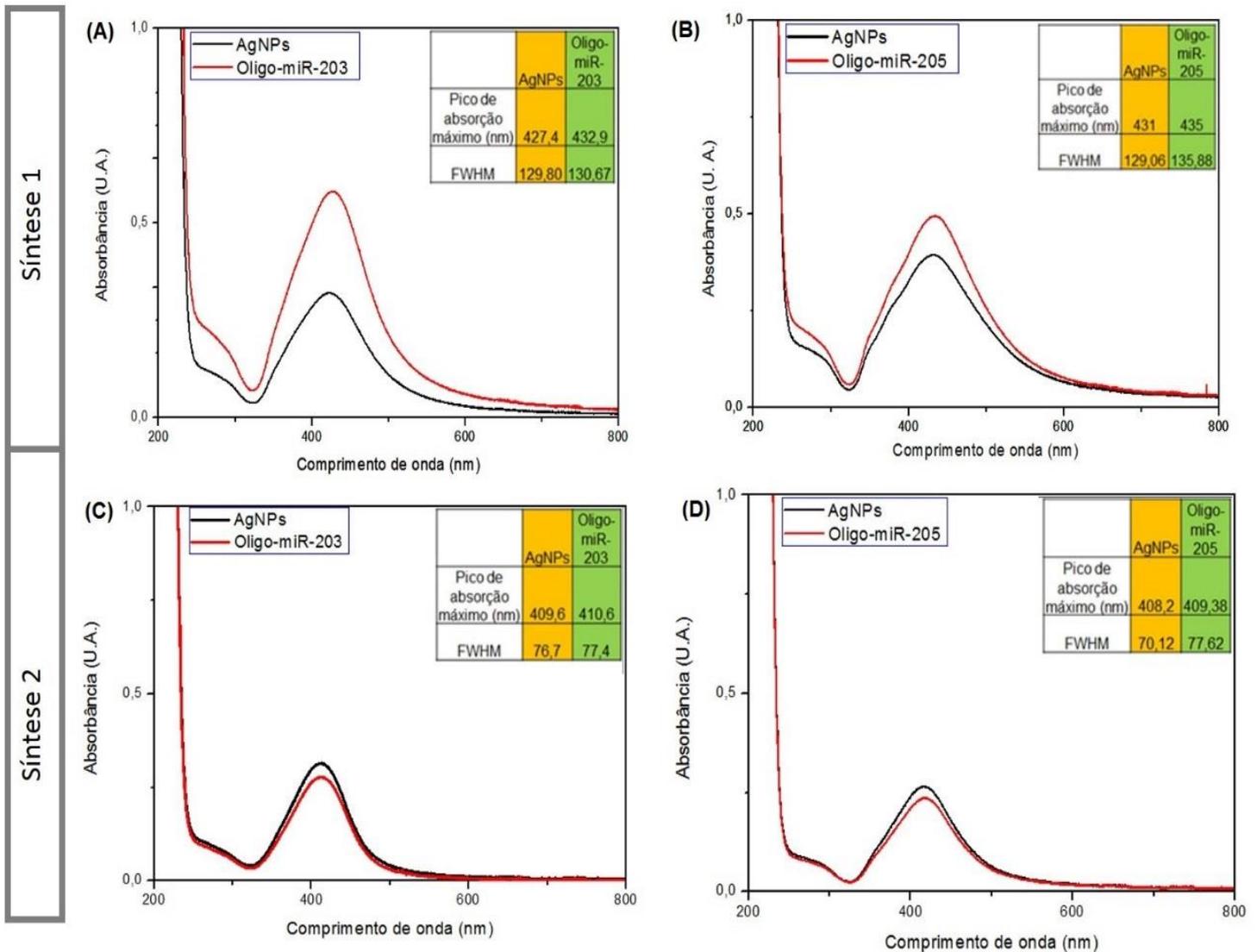
se acoplesse facilmente à superfície metálica das AgNPs (“Thiol SS Dipod Oligo Modifications from Gene LinK”, [2018]).

Como tal procedimento não havia sido realizado, as metodologias de imobilização aplicadas no tratamento 1 e 2 tornaram o estudo inexecutável.

A insistência no uso do tiol como ligante em superfícies metálicas ocorreu pela sua ação como espaçador entre os oligo-miRs acoplados nas AgNPs reduzindo a probabilidade de uma aproximação e, conseqüentemente, interação não específica entre os oligo-miRs adsorvidos à superfície das AgNPs, facilitando então, a hibridização com os microRNAs-alvo (YIN *et al.*, 2013).

Neste ensaio, com a redução do ditiol foi possível constatar o deslocamento da banda de absorção plasmônica das AgNPs, após a adição dos oligo-miRs em ambas as sínteses (Figura 22).

Figura 22 - Comparação da absorção plasmônica das AgNPs modificadas e não modificadas. **Síntese 1:** (A) linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas com oligo-miR-203. (B) linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas com o oligo-miR-205. **Síntese 2:** (C) linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas com oligo-miR-203. (D) linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas como oligo-miR-205.



Esse deslocamento é proveniente da substituição completa dos íons citrato, fracamente adsorvidos na superfície das AgNPs, pelos oligo-miRs tiolados que, ao se ligarem covalentemente à superfície das nanopartículas promovem a formação de aglomerados (Figuras 23 e 24) (RACHKOV, 2014; ZAMAN *et al.*, 2014).

Na síntese 1, além do grande deslocamento para a região do infravermelho da banda de absorção plasmônica (Figura 22 (A) 5,5 nm; (B) 4 nm), observou-se também um aumento na intensidade de absorbância com a adição do oligo-miR-203 e oligo-miR-205.

Estudos indicam que partículas ou agregados maiores exibem uma banda plasmônica mais intensa (MAAYAN; LIU, 2011). Desse modo, a formação de aglomerados comprovou a ligação entre o grupamento tiol à superfície das AgNPs (KASTRATI, 2018).

Além disso, o aumento do fwhm expresso no gráfico da figura 22 (A e B) indicou a variação na distribuição de tamanho das partículas, ocasionada pela adsorção dos oligo-miRs, evidenciando a efetividade do processo de imobilização das biomoléculas (AGNIHOTRI, 2014).

Na síntese 2, após a adição dos oligo-miRs notou-se um deslocamento plasmônico menor quando comparado aos resultados expressos na síntese 1 (Figura 22 (C) 1 nm; (D) 1,18 nm). Segundo estudos, partículas e aglomerados menores resultam em um pico de absorção em comprimentos de onda menores. Desse modo, quanto menor é o diâmetro das partículas menor será o deslocamento plasmônico (KASTRATI, 2018).

Notou-se ainda que o valor de fwhm expresso após a adesão das biomoléculas na superfície das AgNPs foi menor do que o expresso nos resultados das partículas produzidas na síntese 1.

Cennamo *et al.* (2011) e Sileikaite *et al.* (2009) mostraram que o fwhm pode ser utilizado como um parâmetro fundamental no desenvolvimento e planejamento de um sensor. De acordo com esses estudos, quanto menor é o valor desse parâmetro, mais estreito será o pico de absorção e, melhor será a relação sinal/ruído do sensor. Tal característica implica então, na sensibilidade do dispositivo de detecção, mostrando que quanto menor o fwhm maior será a sensibilidade do sensor em detectar de forma precisa as pequenas alterações ocorridas na camada superficial das AgNPs (CENNAMO *et al.*, 2011; SILEIKAITE *et al.*, 2009).

Desse modo, verificou-se que síntese 2 apresentou resultados melhores no que se ao fwhm.

Na síntese 2 notou-se ainda, uma diminuição no valor da intensidade de absorvância após a adição dos oligo-miRs. Esse resultado pode estar associado ao processo de aglomeração das partículas.

Kastrati (2018) revela que quando as partículas se agregam há uma diminuição na sua estabilidade e, em decorrência, ocorre o esgotamento das nanopartículas estáveis. Esse processo desencadeia uma alteração no espectro de absorção, diminuindo a intensidade do pico e ampliando-o para comprimento de ondas maiores (KASTRATI, 2018).

Todas essas alterações ocorridas nas propriedades ópticas das AgNPs indicam que o tratamento 3 apresentou um resultado satisfatório no que se refere a imobilização dos oligo-miRs.

5.3.1.1 Caracterização do conjugado AgNP-oligo-miR

Em ambas as sínteses, como citado no item acima, a ligação dos oligo-miRs nas AgNPs promoveu um aumento nas forças atrativas de *van der Waals* e a diminuição das forças repulsivas de *Coloumb* entre as partículas, originando o processo de aglomeração (LEERMAKERS; ERIKSSON; LYKLEMA, 2005).

A formação de aglomerados proveniente dessa imobilização foi observada através de imagens de AFM. Nestas, ao comparar com as AgNPs não modificadas, visualizou-se um aumento no diâmetro das AgNPs devido à aproximação das partículas e uma variação na distribuição de tamanhos na suspensão após a modificação da camada superficial das AgNPs (comprovado pelo aumento no fwhm) (AGNIHOTRI *et al.*, 2013).

Nas sínteses 1 e 2, verificou-se ainda que a aglomeração foi pronunciada em ambos os sistemas contendo os oligo-miRs (Figura 23 e 24). Em contrapartida, somente na síntese 2, o estudo de imobilização revelou a presença de agregados de oligo-miR-203 e oligo-miR-205 (aspecto de linha na imagem) juntamente com as partículas (YANG *et al.*, 2009). Tal resultado confirma a afirmação de Kastrati (2018) em relação ao estudo espectral, mostrando novamente que a síntese 2 é responsável por originar partículas e aglomerados menores de tamanhos compatíveis às biomoléculas estudadas (KASTRATI, 2018; HOO *et al.*, 2008).

Figura 23 - Imagem da amostra de AgNPs da síntese 1 obtidas por AFM. (1) imobilização do oligo-miR-203. (2) imobilização do oligo-miR-205. (A) imagem bidimensional em uma área de varredura de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ (1) e $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (2), (B) imagem bidimensional em uma área de varredura de $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$ (1) e $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ (2) e (C) imagem tridimensional da mesma amostra.

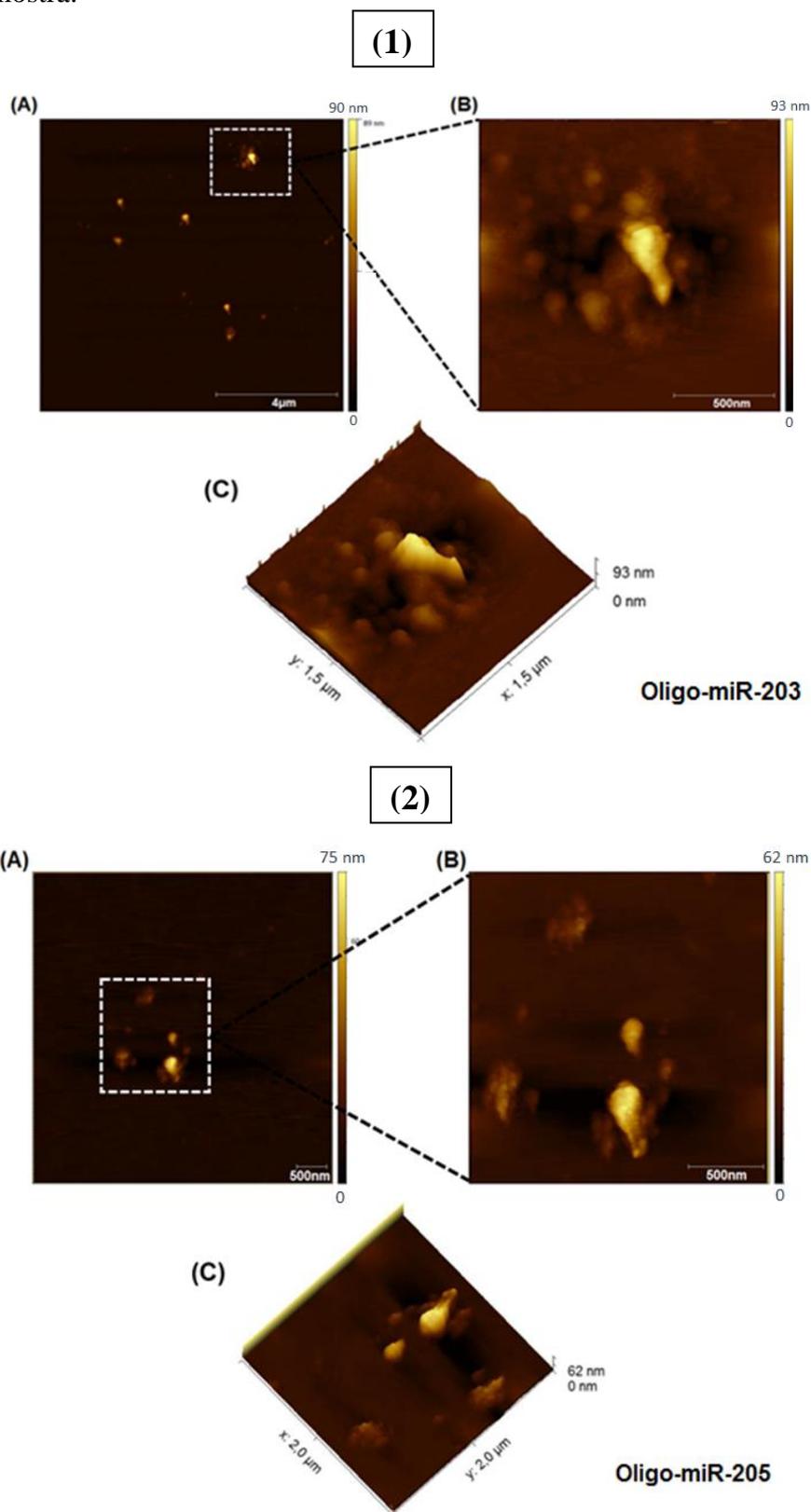
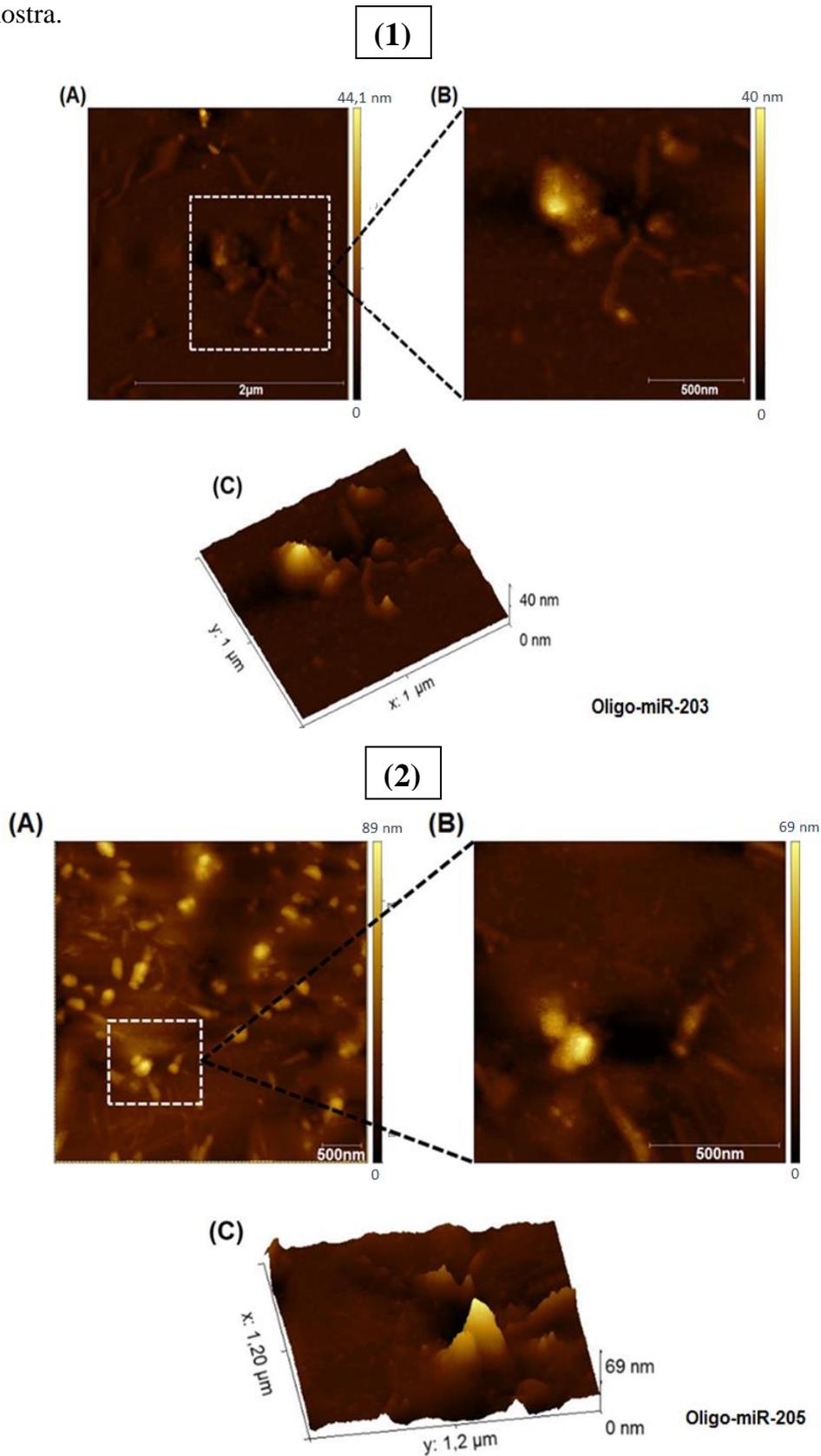


Figura 24 - Imagem da amostra de AgNPs da síntese 2 obtidas por AFM. (1) imobilização do oligo-miR-203. (2) imobilização do oligo-miR-205 (A) imagem bidimensional em uma área de varredura de $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$, (B) imagem bidimensional em uma área de varredura de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ (1) e $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}^2$ (2) e (C) imagem tridimensional da mesma amostra.



Com todos os resultados obtidos referente à etapa imobilização dos oligo-miRs constatou-se, então, que o ligante tiol em sua forma reduzida pode ser útil na construção de nanobiossensores promissores que atuem na detecção de marcadores moleculares, inclusive de neoplasias malignas (YANG; VOSCH, 2011; GAO *et al.*, 2012). Assim, o protocolo 3 foi escolhido como a melhor alternativa a ser seguida nos experimentos deste trabalho.

5.4 SENSORIAMENTO DE microRNAs UTILIZANDO OS CONJUGADOS AgNPs-OLIGO-miR-203 e AgNPs-OLIGO-miR-205

5.4.1 Condições fixas de tempo (10 min) e temperatura de reação (70°C)

Para esse teste, é válido ressaltar que a metodologia utilizada para a hibridização entre as AgNPs modificadas e os microRNAs específicos foi fundamentada em uma adaptação do protocolo proposto por Borghei *et al.* (2015) (BORGHEI *et al.*, 2015).

A interação entre os oligo-miRs e os microRNAs, portanto, foi mediada pela complementaridade de bases nitrogenadas, por meio de ligações de hidrogênio em um processo denominado de hibridização (JÚNIOR, 2010; STRACHAN; READ, 2013).

Para garantir o sucesso da hibridização, os oligo-miRs e os microRNAs devem estar totalmente livres para a possível interação entre ambos. Desse modo, controlar a temperatura de *Melting* (TM) é de suma importância nos processos de desnaturação (separação) e anelamento entre os oligo-miRs e seus alvos (Figura 25) (JÚNIOR, 2010; STRACHAN; READ, 2013).

A TM é específica para cada oligo-miR e microRNA complementar, como apresentado na tabela 2. Esta corresponde à transição entre os estados de fita-simples e duplex, indicando que 50% das fitas estão na forma simples e, as demais, em dupla-fita (MACDONALD; JERRIS; BENNETT, 2018).

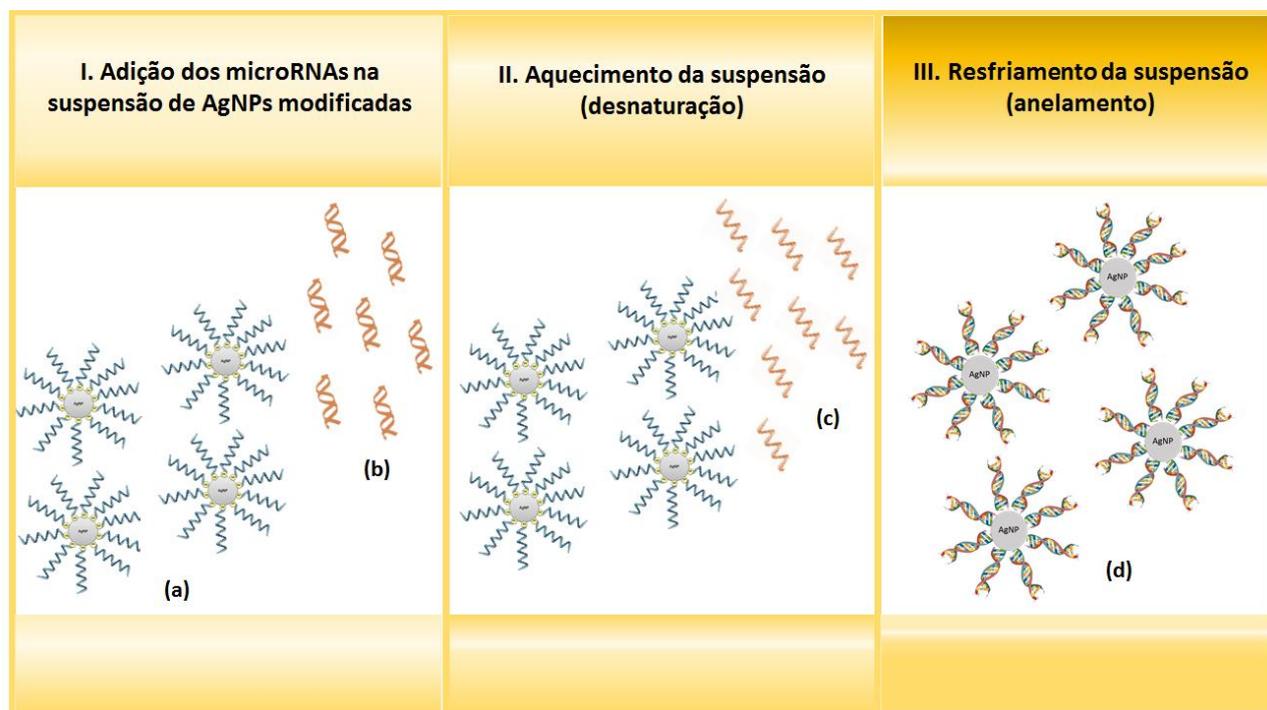
Temperaturas acima da TM promovem a desnaturação do duplex e garantem a eficiência na hibridização em testes de detecção, visto que, o aquecimento promove o enfraquecimento do pareamento de bases e, conseqüentemente, o rompimento das ligações de hidrogênio responsáveis por unir de forma inespecífica os microRNAs (Figura 25 – I e II) (ZHANG; CHEN; YIN, 2012). Sabendo disso, neste estudo, as condições preliminares de interação foram mantidas em 70 °C, uma vez que a TM para o

oligo-miR-203, oligo-miR-205 e seus alvos específicos eram de 50, 9 °C e 58,6 °C respectivamente.

Para avaliar a estabilidade das AgNPs sob altas temperaturas foi realizado um teste visual que buscou analisar a coloração e a presença de precipitados nas suspensões coloidais. Com essa investigação, notou-se que o aquecimento até 70 °C não promoveu a alteração da coloração e, ainda, notou-se a ausência precipitados proveniente da prata metálica nas suspensões.

Para a hibridização após o aquecimento da suspensão contendo o conjugado AgNP-oligo-miRs e os microRNAs específicos, esta foi resfriada até atingir uma temperatura abaixo da T_M (aproximadamente 37 °C), para propiciar o anelamento e formação do duplex entre os oligo-miRs imobilizados e os microRNAs disponíveis no sistema (Figura 25 – III) (STRACHAN; READ 2013).

Figura 25 - Esquema representativo do processo de hibridização entre as AgNPs modificadas e o microRNAs. I – Representa a adição dos microRNAs na suspensão de AgNPs modificadas. II – Representa a etapa de aquecimento à uma temperatura acima da T_M para favorecer a desnaturação dos microRNAs e permitir a ligação específica com os oligo-miRs. III – Representa a etapa de resfriamento da suspensão, em que a temperatura atinge um valor abaixo da T_M favorecendo o anelamento específico entre o sensor e o alvo. (a) AgNPs modificadas; (b) duplex formado pela interação não específica entre as fitas dos microRNAs, (c) microRNAs desnaturados e (d) Formação do duplex entre os oligo-miRs e os microRNAs.



Fonte: DO AUTOR.

Com esse estudo, em ambas as sínteses, após a hibridização dos microRNAs-alvos foi possível observar um deslocamento e um aumento na absorbância plasmônica das partículas.

Na síntese 1, notou-se um deslocamento de 432,9 nm (AgNPs modificadas com o oligo-miR-203) para 435,3 nm após a adição do miR-203 (Figura 26-A). No segundo sistema, a variação foi de 435 nm (AgNPs modificadas com o oligo-miR-205) para 438 nm após a adição do miR-205 (Figura 26-B).

Na síntese 2, notou-se que o deslocamento no primeiro sistema variou de 410,6 nm (AgNPs modificadas com o oligo-miR-203) para 415,1 nm, após o contato das AgNPs com miR-203 (Figura 26-C). No segundo sistema, o deslocamento plasmônico foi de 409,38 nm (AgNPs modificadas com o oligo-miR-205) para 413,3 nm (Figura 26-D).

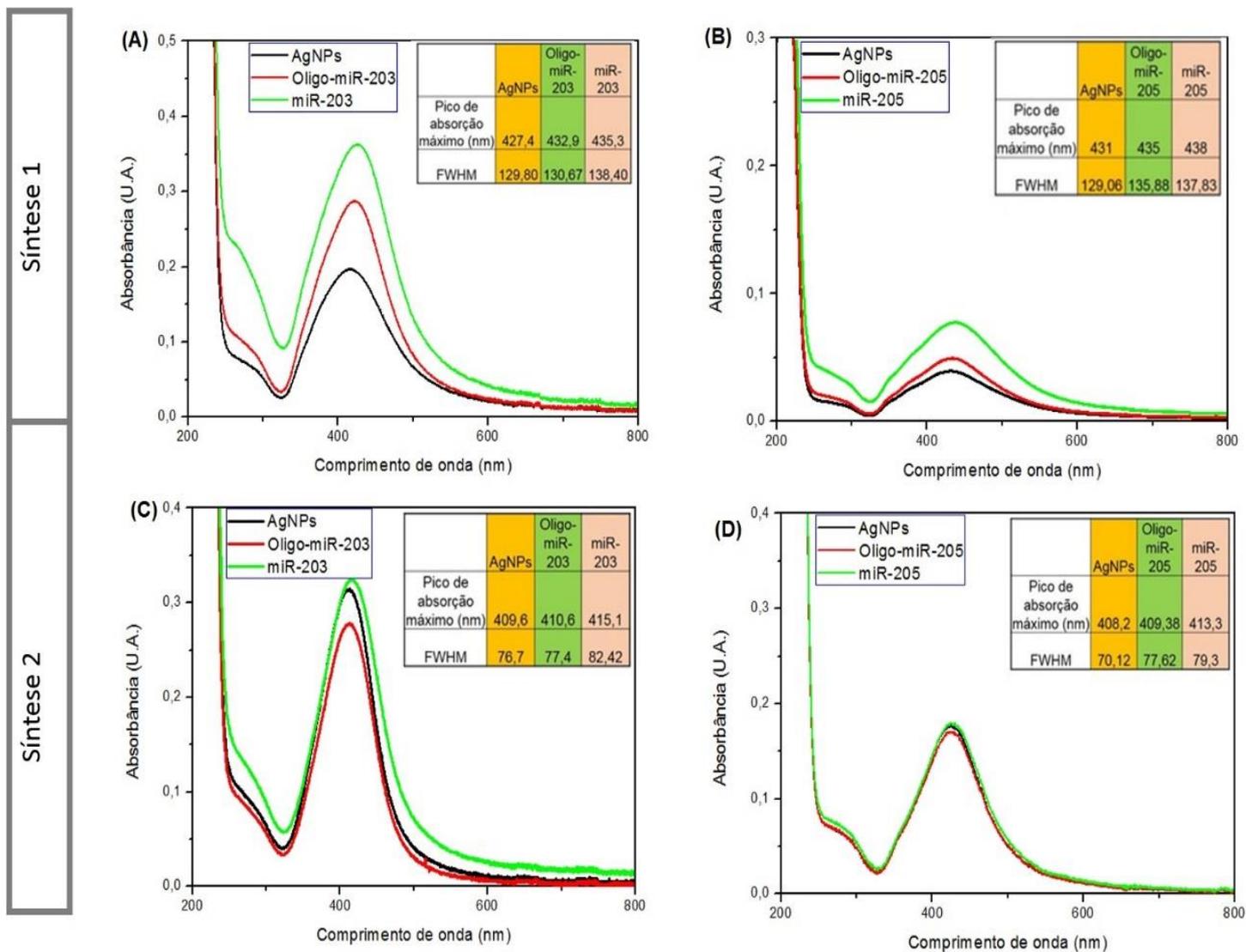
Tais resultados revelaram que, na síntese 2, as partículas exibiram um deslocamento de bandas de absorção maior em ambos os sistemas (Figura 26 - (C) 4,5 nm; (D) 3,92 nm), em relação às partículas da síntese 1 (Figura 26 - (A) 2,4 nm; (B) 3 nm).

Isso mostrou que partículas menores são caracterizadas por apresentarem alta sensibilidade no reconhecimento de moléculas específicas (HOO *et al.*, 2008).

Além das mudanças espectrais observadas, em ambas as sínteses, notou-se nos diferentes sistemas, um aumento no fwhm após a interação com os alvos específicos, fato que comprova o reconhecimento dos alvos pelas AgNPs modificadas (SILEIKAITE *et al.*, 2009; GORUP *et al.*, 2011).

A partir desse e demais resultados apresentados anteriormente, a síntese 2 mostrou-se mais efetiva para os estudos biomédicos, uma vez que seus parâmetros sensoriais foram melhores. Desse modo, essa síntese foi escolhida como a melhor alternativa a ser seguida nos próximos experimentos desse trabalho devido produzir partículas menores e mais homogêneas.

Figura 26 - Comparação da absorção plasmônica das AgNPs modificadas e não modificadas. **Síntese 1:** (A) linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas com oligo-miR-203; linha verde - interação com o miR-203 (B) linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas como oligo-miR-205; linha verde - interação com o miR-205. **Síntese 2:** (C) linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas com oligo-miR-203; linha verde - interação com o miR-203. (D) linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas como oligo-miR-205; linha verde - interação com o miR-205.



5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO SENSOR POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia na região do infravermelho permite investigar as transições vibracionais de compostos moleculares, a partir da interação da radiação eletromagnética com a matéria (SKOOG *et al.*, 2009).

No presente estudo, no primeiro sistema referente ao miR-203 (Figura 27), o espectro da amostra de AgNPs apresentou vibrações nos intervalos de frequência de 1655-1513 cm^{-1} e 1450-1330 cm^{-1} (Figura 27-A). O primeiro intervalo é correspondente às vibrações de estiramento nas ligações C=O e o segundo refere-se ao dobramento da ligação O-H, ambas frequências referentes aos íons citrato. Isso indica que tais moléculas estão ligadas à superfície das partículas nanométricas (KORA; BEEDU; JAYARAMAN, 2012; FROST; DEMPESEY; WHITEHEAD, 2016).

Com a imobilização do oligo-miR-203, observou-se a presença de três novos picos em 1064 cm^{-1} , 863 cm^{-1} e 658 cm^{-1} (Figura 27-B). De acordo com estudos, os picos 863 cm^{-1} e 658 cm^{-1} referem-se aos modos vibracionais de ligação C-S, o que indica a ancoragem da molécula de DTPA nas AgNPs (RADHAKRISHNAN, 2013; PATIL *et al.*, 2015).

Já a vibração em 1064 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo carbonila presente no açúcar desoxirribose do oligo-miR-203, fato que constata a associação desse oligo-miR à superfície das AgNPs (RADHAKRISHNAN, 2013).

O espectro das AgNPs modificadas em interação com o miR-203 revelou picos vibracionais em: 3400 cm^{-1} , 1236 cm^{-1} , 900 cm^{-1} e 600 cm^{-1} (Figura 27-C).

A banda observada em 1236 cm^{-1} caracteriza as vibrações de estiramento do íon fosfato presente nas moléculas de DNA (PATIL *et al.*, 2015). Fato que comprova a efetividade do processo de imobilização do oligo-miR-203 na superfície das AgNPs.

As vibrações ocorridas em 3400 cm^{-1} e 900 cm^{-1} referem-se ao estiramento do grupo amina (N-H) durante a formação das ligações de hidrogênio provenientes da hibridização entre as AgNPs modificadas e o miR-203 e, em 600 cm^{-1} as vibrações referem-se às deformações ocorridas nas ligações C-H proveniente da interação (“Typical Infrared Absorption Frequencies”, [2018]; RADHAKRISHNAN, 2013).

No segundo sistema, referente ao miR-205, os espectros apresentaram grandes similaridades aos espectros do miR-203 (Figura 28). Para o espectro da amostra de

AgNPs visualizou-se também as vibrações nos intervalos de frequência de 1655-1513 cm^{-1} e 1450-1330 cm^{-1} (Figura 28-A). Fato que indicou a formação das AgNPs (KORA; BEEDU; JAYARAMAN, 2012; FROST; DEMPESEY; WHITEHEAD, 2016).

Com a imobilização do oligo-miR-205, observou-se a presença de dois picos iguais aos observados na imobilização do oligo-miR-203 (Figura 28-B). A presença da vibração em 863 cm^{-1} comprovou a ligação do grupamento ditiol na superfície das nanopartículas metálicas (RADHAKRISHNAN, 2013; PATIL *et al.*, 2015). Já o pico em 1064 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da carbonila presente no açúcar desoxirribose, comprovou novamente essa efetividade do protocolo de imobilização na ancoragem do oligo-miR à superfície das AgNPs (RADHAKRISHNAN, 2013).

Com a interação específica, entre AgNPs modificadas e o miR-205, foi possível visualizar somente os picos vibracionais em: 1236 cm^{-1} , 900 cm^{-1} e 600 cm^{-1} (Figura 28-C).

Como já citado, a vibração em 1236 cm^{-1} revela a efetividade no processo de imobilização do oligo-miR-205, visto que esta vibração caracteriza o estiramento do íon fosfato presente nos oligo-miRs, quando este último se liga às AgNPs (PATIL *et al.*, 2015).

Já os picos em 900 e 600 cm^{-1} são vibrações que caracterizam a interação, uma vez que a primeira indica o estiramento do grupo amina, devido a ocorrência das ligações de hidrogênio entre o oligo-miR e o microRNA específico, e a segunda, indica a deformação nas ligações C-H (“Typical Infrared Absorption Frequencies”, [2018]; RADHAKRISHNAN, 2013).

Figura 27 - Espectro de FTIR das AgNPs (linha preta), AgNPs modificadas (linha vermelha) e interação com o miR-203 (linha verde).

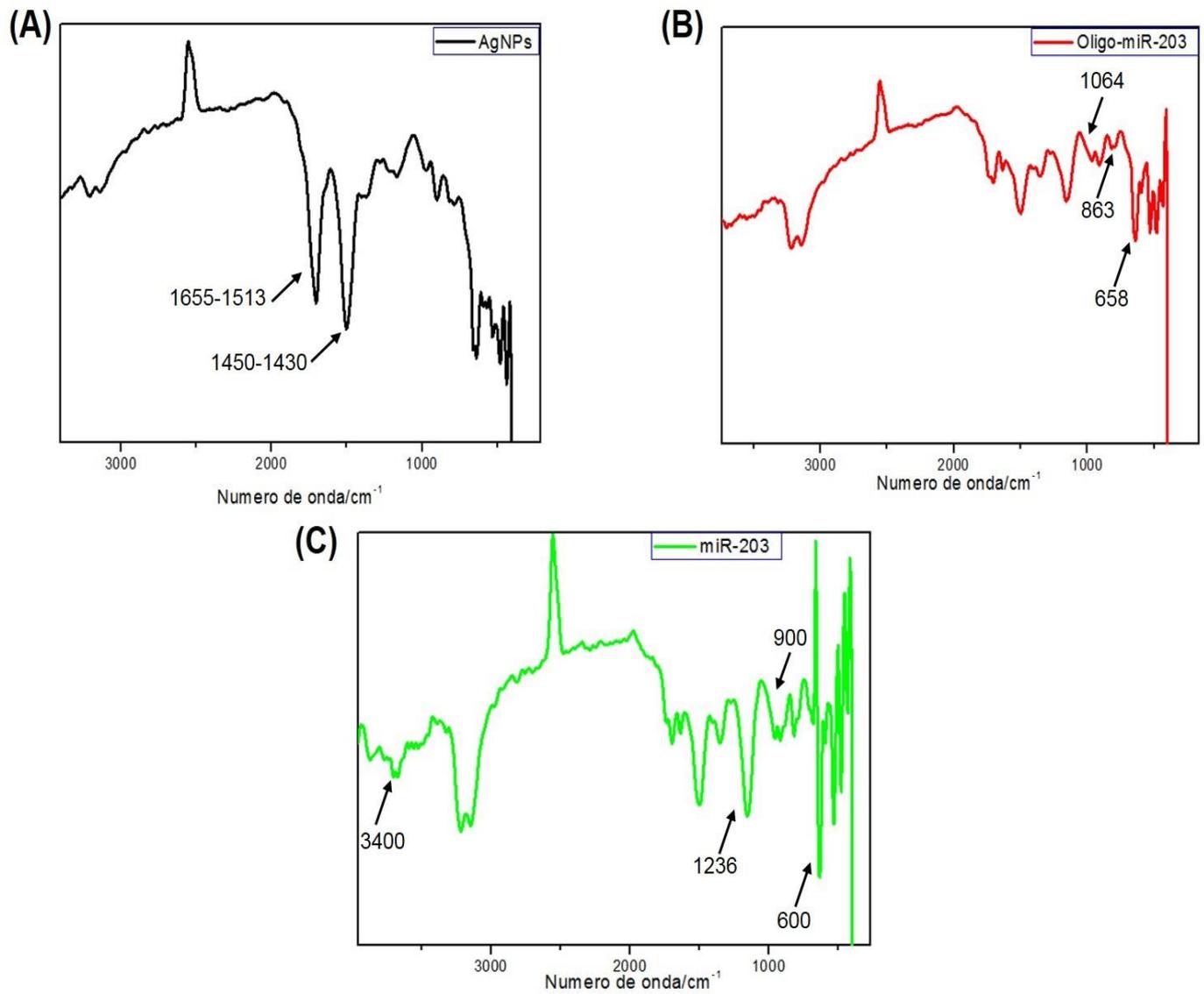
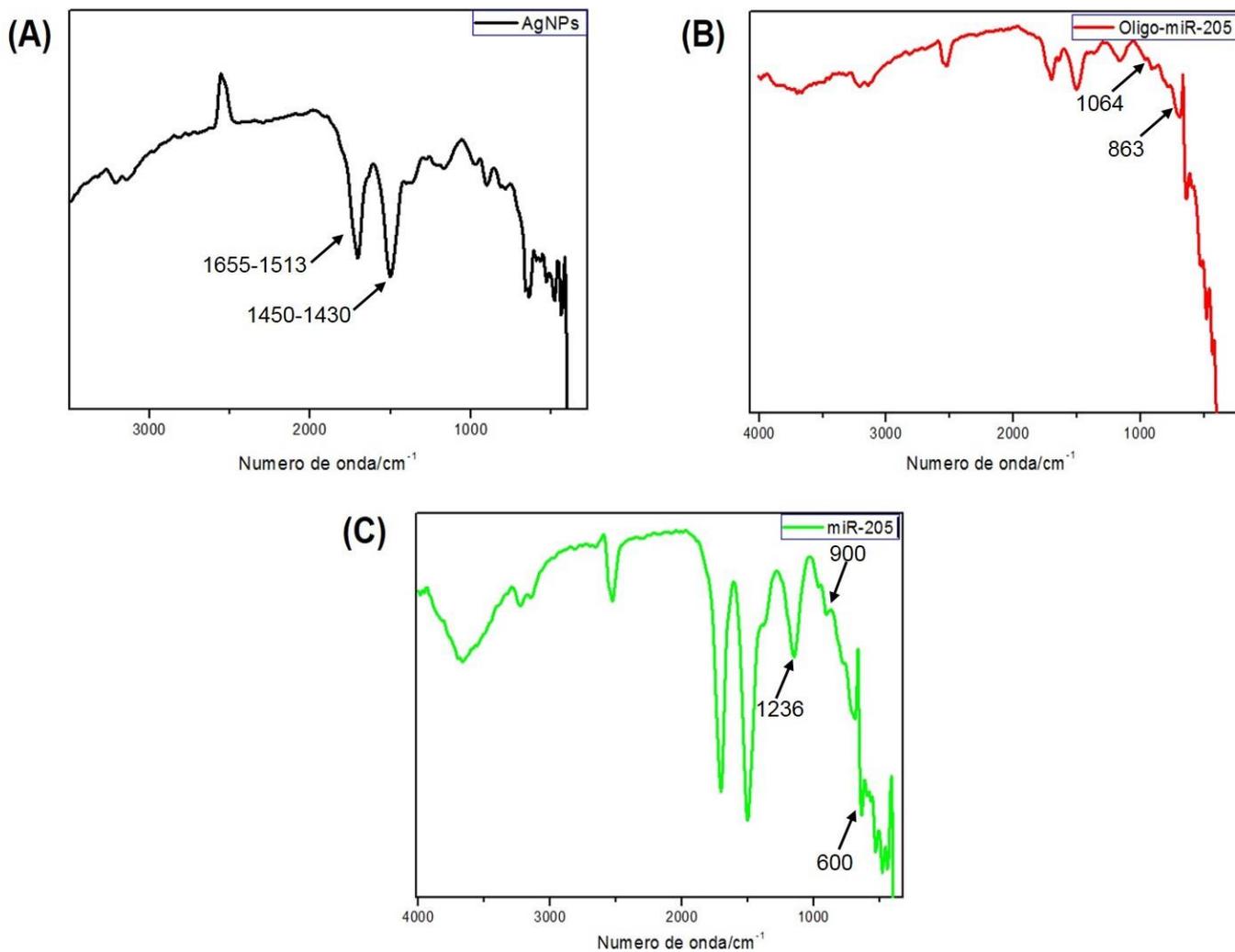


Figura 28 - Espectro de FTIR das AgNPs (linha preta), AgNPs modificadas (linha vermelha) e interação com o miR-205 (linha verde).



Assim, a análise dos espectros permitiu comprovar a imobilização dos oligo-miRs e a interação do conjugado AgNP-oligo-miR com os microRNAs específicos, a partir da identificação dos grupos funcionais presentes. A presença de picos característicos em cada etapa demonstrou a efetividade do dispositivo construído no reconhecimento de microRNAs específicos.

5.6 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SENSOR

5.6.1 Condições variadas de tempo e temperatura de reação

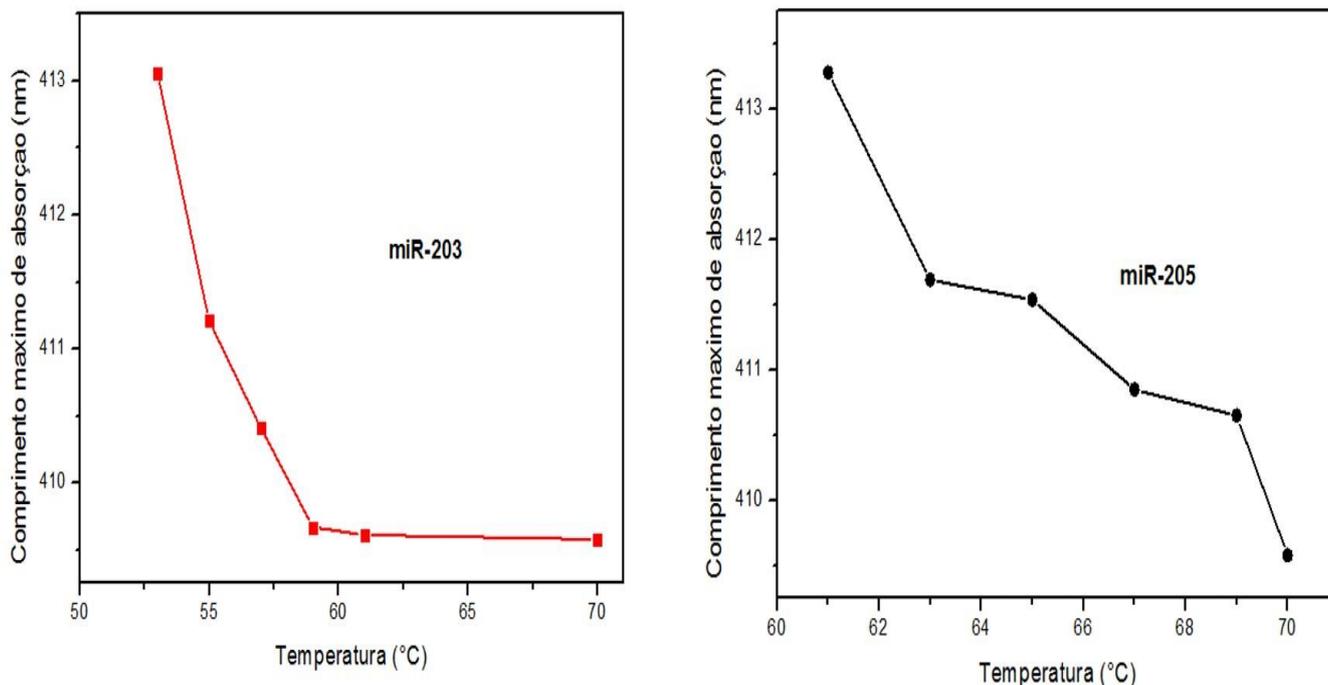
Para determinar a condição ideal de hibridização foi realizada uma investigação para selecionar a temperatura ideal de desnaturação (acima da TM) e garantir o anelamento total entre o oligo-miR-203 e miR-203 e, o oligo-miR-205 e miR-205.

Com esse teste, foi possível observar em ambos os sistemas que, quanto menor é o aquecimento da suspensão (acima da TM) maior é a interação entre os oligo-miRs e os microRNAs específicos (Figura 29).

Para o sistema do miR-203, ao analisar os espectros, notou-se que a temperatura de 53°C (2°C acima da TM) apresentou um deslocamento de banda maior (pico máximo em 413,1 nm), quando comparada às outras temperaturas investigadas. Fato que demonstra uma maior efetividade na formação dos híbridos. Já para o miR-205, a temperatura de 61°C, 2 °C acima da TM, com pico de absorção máximo em 413,3 nm, apresentou maior efetividade nesse processo.

Sabe-se que o aquecimento está diretamente associado à taxa de aglomeração das partículas, dessa forma, aquecer a suspensão em temperaturas menores pode contribuir para uma menor interferência na relação sinal/ruído do sensor e promover uma maior sensibilidade na detecção de pequenas perturbações do sistema. Isso, conseqüentemente, contribui para melhores resultados no sensoriamento (JIANG *et al.*, 2011; CENNAMO *et al.*, 2011).

Figura 29 - Comparação da temperatura de aquecimento ideal determinada para cada microRNA estudado.



Determinada a temperatura ideal para os sistemas do miR-203 e miR-205, uma nova investigação foi realizada, a fim de determinar o tempo de aquecimento ideal, durante a etapa de hibridização para cada sistema investigado.

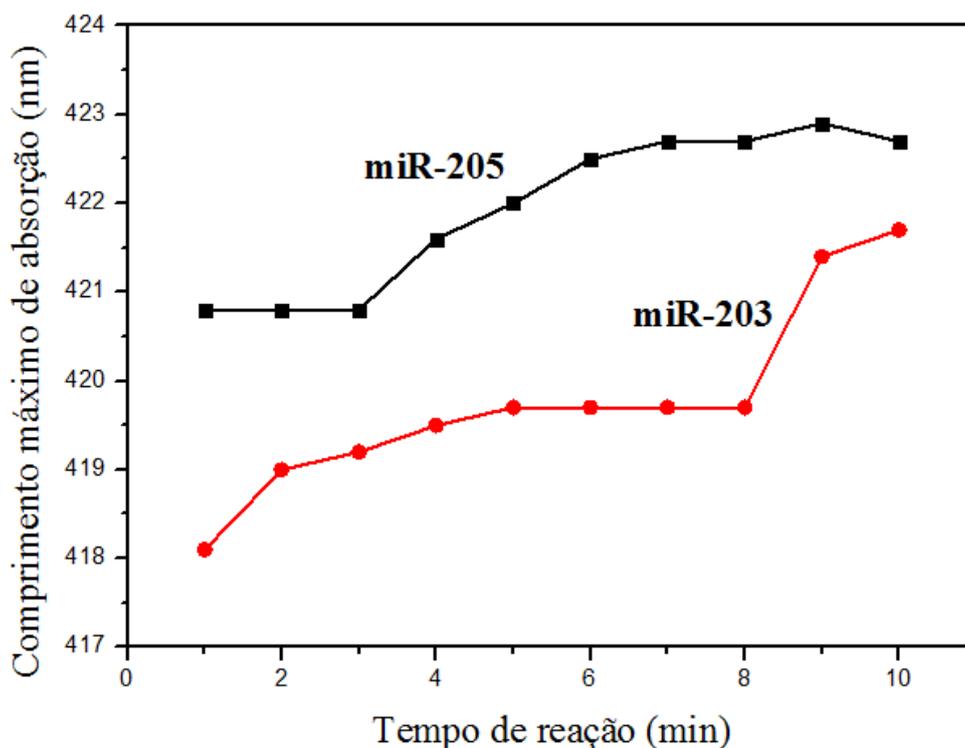
Com esse teste percebeu-se que, para o sistema contendo o miR-203, ocorreu um grande salto da variação plasmônica no tempo de 8 min para 9 min. Além disso, à medida que aumentava-se o tempo de reação foi observado que o deslocamento também aumentou, porém esse aumento ocorreu de forma mais gradual. Já para o sistema contendo o miR-205, o aumento do deslocamento da banda plasmônica ocorreu de forma gradual e contínua, todavia ao manter a suspensão aquecida em tempos superiores à 9 min notou-se a diminuição do deslocamento da banda de absorção. O teste mostrou que, o sistema contendo o miR-203 requer um tempo de aquecimento maior para desnaturar as suas fitas quando comparado ao sistema contendo o miR-205 (Figura 30).

A explicação para tal fato pode estar fundamentada na quantidade de guaninas e citosinas presentes na amostra, visto que a estabilidade dessas bases nitrogenadas é mediada por um número maior de ligações de hidrogênio quando comparada às bases timina e adenina (OLIVEIRA, 2017).

De acordo com os dados da tabela 2, as sequências de microRNAs apresentam um número similar de guaninas e citosinas em sua composição (miR-203 um número total igual a 9 e, miR-205 um número total igual a 12).

A figura 29 demonstrou ainda, que a temperatura de aquecimento ideal para o miR-203 foi menor (52°C) que a temperatura de aquecimento ideal para o miR-205 (61°C). Dessa forma, sabendo que a temperatura de desnaturação foi menor, para o anelamento específico entre o oligo-miR-203 e o miR-203 foi necessário um tempo de aquecimento maior para garantir a efetividade no rompimento das três ligações de hidrogênio, responsáveis por estabilizar a interação não específica entre as bases nitrogenadas das fitas dos microRNAs e, desnaturar então, o miR-203 para a ocorrência da hibridização. (OLIVEIRA, 2017).

Figura 30 - Comparação do tempo de aquecimento ideal determinado para cada microRNA estudado.

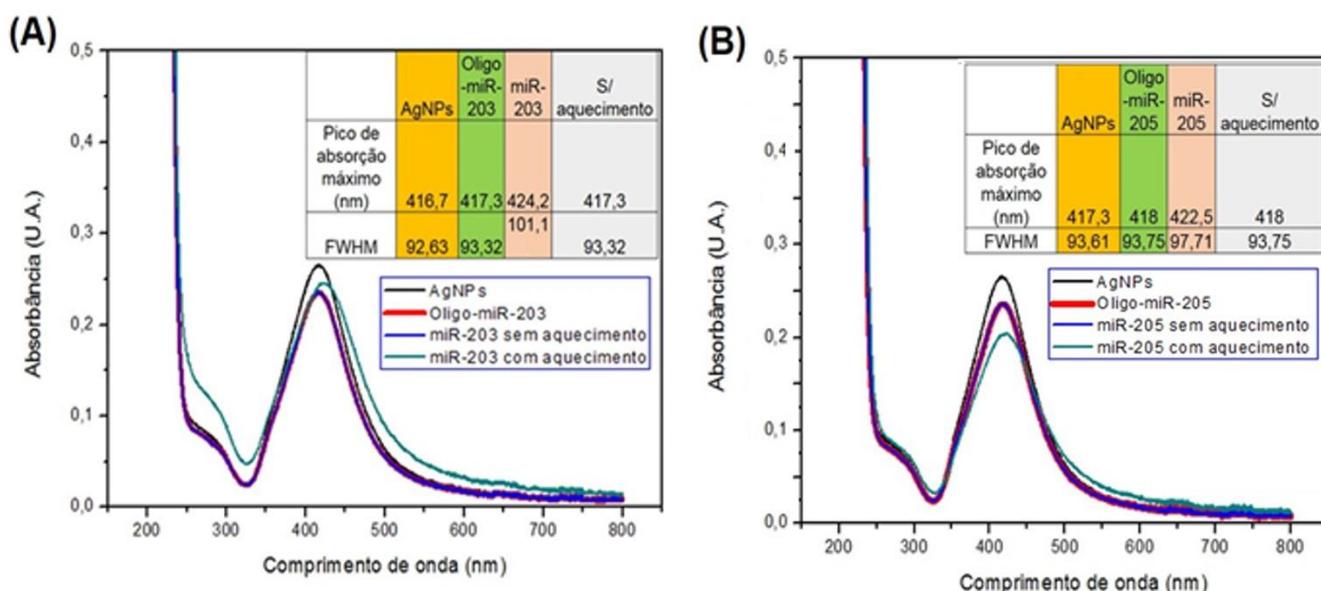


Determinadas as condições ideais para a hibridização, realizou-se a investigação da hibridização nessas condições através de um novo estudo espectral.

5.6.2 Caracterização da otimização do sensor por espectroscopia UV-Vis

Com o estudo espectral da etapa de hibridização, após estabelecer os parâmetros ideais de temperatura e tempo de reação para cada microRNA investigado foi possível observar um deslocamento de banda mais pronunciado após a interação dos conjugados AgNPs-oligo-miRs com os microRNAs (miR-203 o deslocamento foi de 6,9 nm e, miR-205 o deslocamento foi de 4,5 nm) (Figura 31).

Figura 31 - Espectro de absorbância no UV-VIS das AgNPs (linha preta), AgNPs modificadas (linha vermelha), interação com o microRNAs sem aquecimento (linha azul). A linha verde refere-se aos microRNAs adicionados com o aquecimento para a interação. Em (A) espectro referente ao sistema do miR-203 e (B) o sistema referente ao miR-205.



Como já citado, essa diferença na absorção plasmônica que resulta no deslocamento da banda para comprimentos de onda maiores ocorre devido à diminuição do espaço entre as partículas durante a etapa de hibridização devido a interação entre as AgNPs modificadas e o alvo específico (JOHNSON; EVANS; BRYDSON, 1998; YIN *et al.*, 2013; BORASE *et al.*, 2015).

A análise dos espectros mostrou ainda que, a interação específica entre os microRNAs e os conjugados AgNP-oligo-miRs promoveu um aumento no valor de fwhm quando a suspensão era aquecida. Já quando a suspensão não recebia esse tratamento, o valor de fwhm não sofria alteração, mas permanecia igual ao valor correspondente à etapa de imobilização.

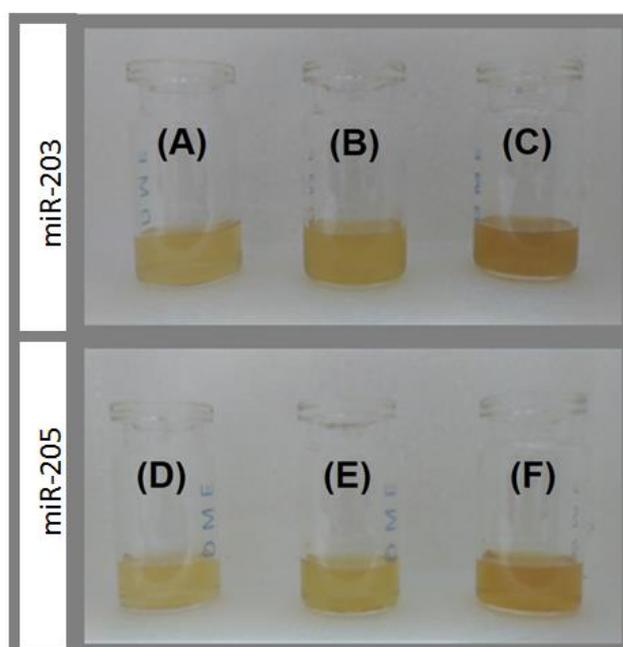
Tal resultado evidencia a importância do aquecimento para a promoção da interação entre os oligo-miRs e microRNAs, uma vez que a ausência desse aquecimento não desnatura os microRNAs unidos de forma inespecífica, o que impede o anelamento entre as AgNPs modificadas e seus respectivos alvos (RAMOS, 2014 STRACHAN; READ, 2013).

Além disso, quando o aquecimento da suspensão coloidal não era executado, não ocorria modificações nas propriedades ópticas das nanopartículas, visto que tal processo não afeta a camada molecular superficial das AgNPs. Fato que impediu o deslocamento da banda plasmônica (DER JEAN *et al.*, 2010).

Já quando ocorre a formação da rede tridimensional de nanopartículas maiores, a mudança na ressonância plasmônica proporciona a variação na intensidade da cor da suspensão coloidal (Figura 32). Isso acontece pois a ligação entre o microRNA específico e seu oligo-miR correspondente promove a instabilidade do sistema e, após a suspensão ser irradiada com a luz UV, ocorre a precipitação da prata, fato evidenciado pela mudança de coloração (MITTELMAN *et al.*, 2015).

Essa propriedade óptica observável à olho nu em 24h após a interação revela, então, o grande potencial das AgNPs como ferramentas promissoras em técnicas de sensoriamento biológico que apresentam uma resposta rápida.

Figura 32 - Imagens das AgNPs. (A) e (D) AgNPs; (B) AgNPs modificadas com oligo-miR-203; (C) Interação com o miR-203, (E) AgNPs modificadas com oligo-miR-205 e (F) Interação com o miR-205.



5.6.2.1 Controle negativo

O sistema controle foi composto pelos microRNAs não específicos às sequências dos oligo-miRs. Neste estudo, repetiu-se o protocolo de hibridização otimizado, porém substituindo os microRNAs específicos pelos não-específicos em um primeiro teste e, água Milli-Q em um segundo teste.

Com a realização desse teste, foi possível observar um deslocamento plasmônico após a interação com os microRNAs não específicos: oligo-miR-203 e miR-205, oligo-miR-205 e miR-203 (Figura 33-A e B respectivamente).

Essa alteração na absorção plasmônica das AgNPs pode ser resultado de uma interação não-específica entre as sequências de nucleotídeos dos oligo-miRs e dos microRNAs não específicos, mesmo que as sequências não apresentem 100% de complementaridade (STRACHAN; READ, 2013).

Para avaliar o grau de identidade dos microRNAs estudados foi feito um alinhamento das sequências nucleotídicas do miR-203 e miR-205 com o *software Clustal X*.

A identidade entre sequências de microRNAs avalia a razão de resíduos idênticos e resíduos provenientes do alinhamento entre duas sequências nucleotídicas (IOSTE, 2016). O valor de identidade encontrado para os miRs foi de 28,6%, um valor extremamente baixo para afirmar que são sequências homólogas, visto que para estes estudos considera-se uma identidade mínima de 70% (CALDART *et al.*, 2016).

Contudo, em se tratando de sequências nucleotídicas, a interação das AgNPs modificadas com os microRNAs não específicos pode ocorrer, já que a molécula de DNA em forma de fita simples tem alta capacidade de formar um duplex por meio do pareamento de bases nitrogenadas, a fim de promover estabilidade conformacional, mantida pelas ligações de hidrogênio intermoleculares das bases (STRACHAN; READ, 2016).

Desse modo, essa interação não específica ocasionou a diminuição do espaço entre as AgNPs, o que promoveu a formação de aglomerados, alterando o espectro de absorção (JOHNSON; EVANS; BRYDSON, 1998; YIN *et al.*, 2013; BORASE *et al.*, 2015).

Repetindo o mesmo procedimento com água Milli-Q observou-se também uma pequena alteração na absorção plasmônica das AgNPs (Figura 34).

Isso pode ter ocorrido, devido a temperatura ter influência na taxa de aglomeração das partículas. Desse modo, o aquecimento da suspensão de AgNPs pode ter modificado

o tamanho das partículas, promovendo um pequeno deslocamento da banda para comprimentos de ondas maiores (JIANG *et al.*, 2011).

Contudo, é válido ressaltar que mesmo com essas variações na banda plasmônica das AgNPs observadas nos controles negativos, notou-se uma alta especificidade do sensor no reconhecimento dos alvos específicos, visto que o deslocamento após a interação específica com o miR-203 e miR-205 é bastante expressivo em comparação aos controles (controles negativos deslocou cerca de 1,5 nm, controles positivos deslocou cerca de 6 nm para o miR-203 e 5 nm para o miR-205) (CHRISNASARI *et al.*, 2013).

Figura 33 - Espectro de absorvância das AgNPs no UV-Vis. Linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas; linha azul - Controle positivo: miR sem aquecimento; linha verde - Controle positivo: miR aquecido. O controle negativo está representado pela linha rosa. (A) Sistema do miR-203 e (B) Sistema do miR-205.

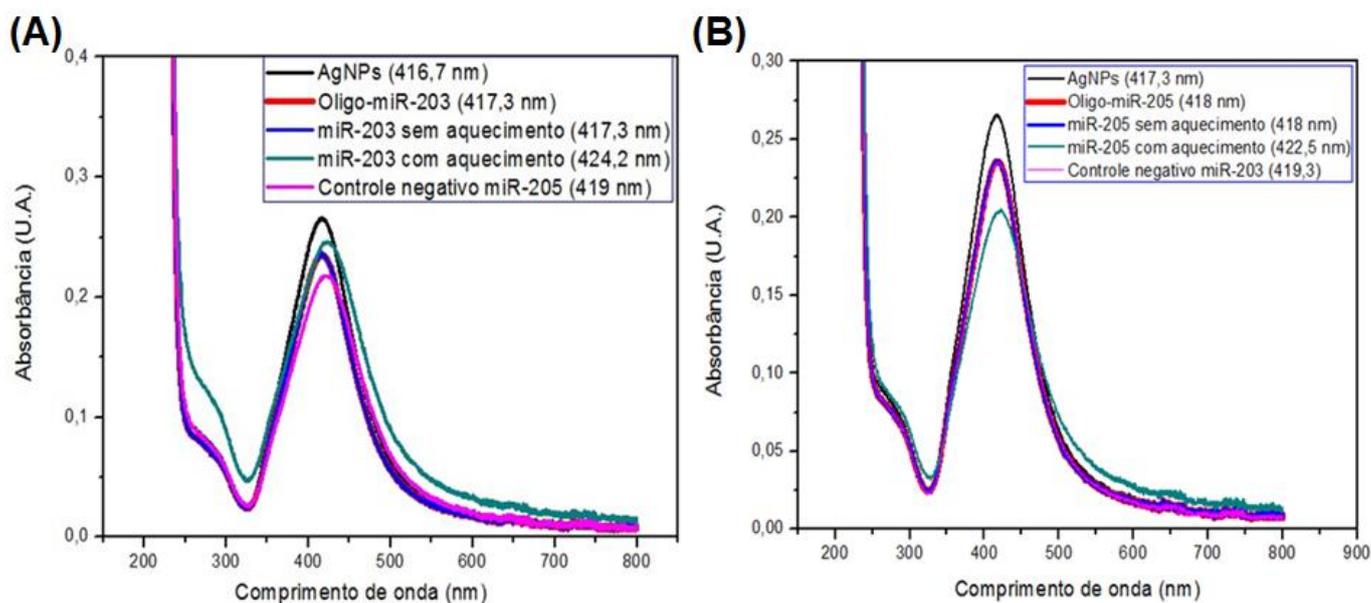
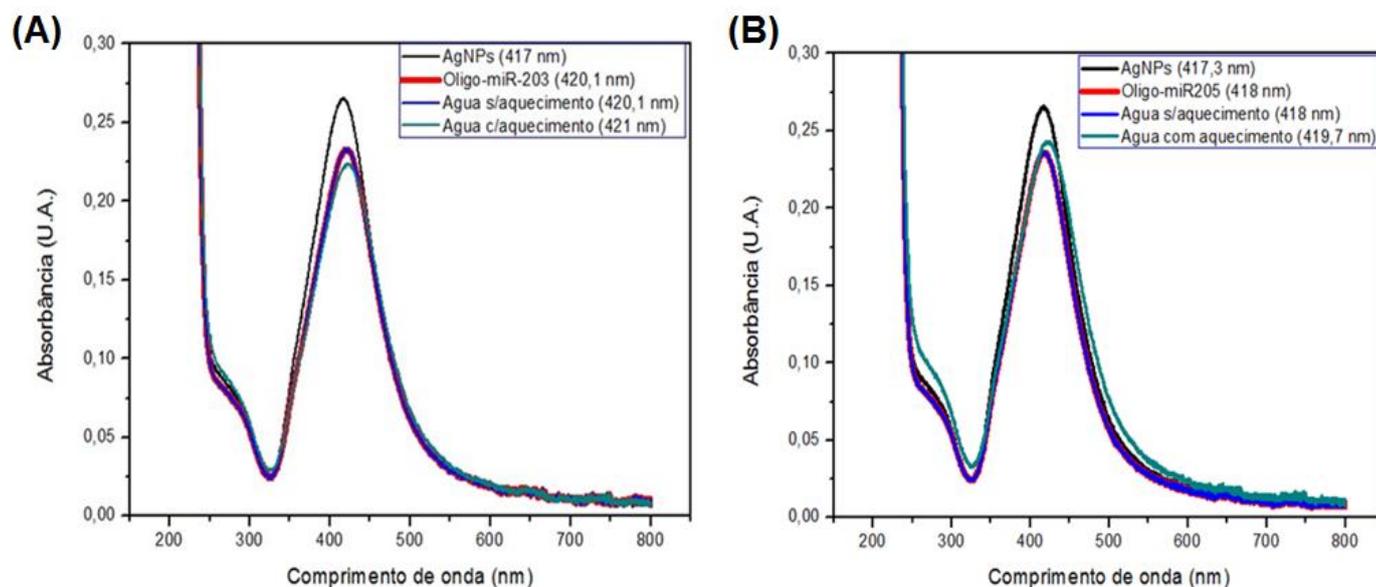


Figura 34 - Espectro de absorbância das AgNPs no UV-Vis. Linha preta - AgNPs; linha vermelha - AgNPs modificadas; linha azul - Controle negativo: Água sem aquecimento; linha verde - Controle negativo: Água aquecida. (A) Sistema do miR-203 e (B) Sistema do miR-205.



5.7 SENSIBILIDADE DO SENSOR

5.7.1 Quantificação do limite mínimo e máximo de microRNAs durante o sensoriamento utilizando o conjugado AgNP-oligo-miRs

Para analisar o limite mínimo de quantificação das AgNPs modificadas, buscou-se analisar o deslocamento da banda plasmônica quando estas partículas foram incubadas com o miR-203 e miR-205 nas seguintes concentrações: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 nM.

Para avaliar o limite máximo de detecção, também foi realizada a incubação das AgNPs modificadas com os microRNAs específicos. Neste teste, buscou-se analisar os deslocamentos nos espectros de absorção das amostras contendo os miR-203 e miR-205, em um intervalo de concentração de 10000 à 50000 nM.

Para o miR-203, utilizou-se o deslocamento da absorbância plasmônica das AgNPs modificadas com o oligo-miR-203 (425 nm) como valor referencial para determinar o limite mínimo e máximo de quantificação do miR-203. Já para o miR-205, utilizou-se o deslocamento das AgNPs modificadas com o oligo-miR-205 (426 nm).

Para o primeiro caso, referente ao miR-203, o estudo do espectro das concentrações diluídas, notou-se que a banda plasmônica variou de 425,05 a 427 nm. Nesse processo de quantificação pode-se perceber que à medida que a concentração do

miR-203 diminui, o deslocamento também é reduzido (Figura 35-A e C). Além disso, observou-se que, a concentração de 0,001 nM indicou o nível mínimo de quantificação do nanobiossensor construído, uma vez que essa concentração apresentou um valor do comprimento de onda de absorção máximo em 425,05 nm, bem próximo ao valor referencial utilizado de 425 nm.

Para o limite máximo de quantificação, observou-se um deslocamento de 425,9 a 427,4 nm, durante o processo de quantificação do miR-203. À medida em que a concentração do analito foi aumentada, observou-se que o deslocamento da absorção plasmônica também aumentou. Todavia, nas concentrações 30000 nM (30 μ M), 40000 nM (40 μ M) e 50000 nM (50 μ M) não houve deslocamento plasmônico, o que permitiu constatar o ponto de saturação de detecção, sendo a concentração equivalente à 30000 nM (30 μ M) de miR-203, determinante para caracterizar o nível máximo de quantificação do nanobiossensor estudado (Figura 35-B e D).

Para o miR-205, ao avaliar o limite mínimo de quantificação, notou-se uma variação da banda plasmônica de 426,1 a 427,2 nm. Nesse processo, verificou-se o mesmo padrão ocorrido para o miR-203 e, que a menor concentração usada (0,001 nM) indicou o nível mínimo de quantificação do sensor, visto que o valor do comprimento de onda de absorção máximo (426,1 nm) quase se igualou ao valor referencial de 426 nm (Figura 36-A e C).

No limite máximo de quantificação, o deslocamento de banda variou de 428 a 428,8 nm. Novamente, viu-se que a medida que a concentração do analito aumentava, o deslocamento da absorção plasmônica também aumentava. Todavia, nas concentrações 40000 nM (40 μ M) e 50000 nM (50 μ M) não ocorreu deslocamento plasmônico. Fato que determinou a concentração de 40000 nM (40 μ M) de miR-205 como sendo o nível máximo de quantificação do nanobiossensor (Figura 36-B e D).

Tais resultados demonstram um funcionamento similar no processo de reconhecimento de ambos os microRNAs estudados.

Figura 35 - Espectro UV-VIS da quantificação do limite mínimo (A) e máximo (B) do miR-203 mediada por AgNPs e variação do comprimento de onda de absorção máximo das AgNPs em interação com o miR-203 em diferentes concentrações. Comprimento de onda da variação máxima da absorbância das AgNPs modificadas (C) em interação com miR-203 em diferentes concentrações na faixa de 0,001 a 100 nM. (D) em interação com miR-203 em diferentes concentrações na faixa de 10000 a 50000 nM.

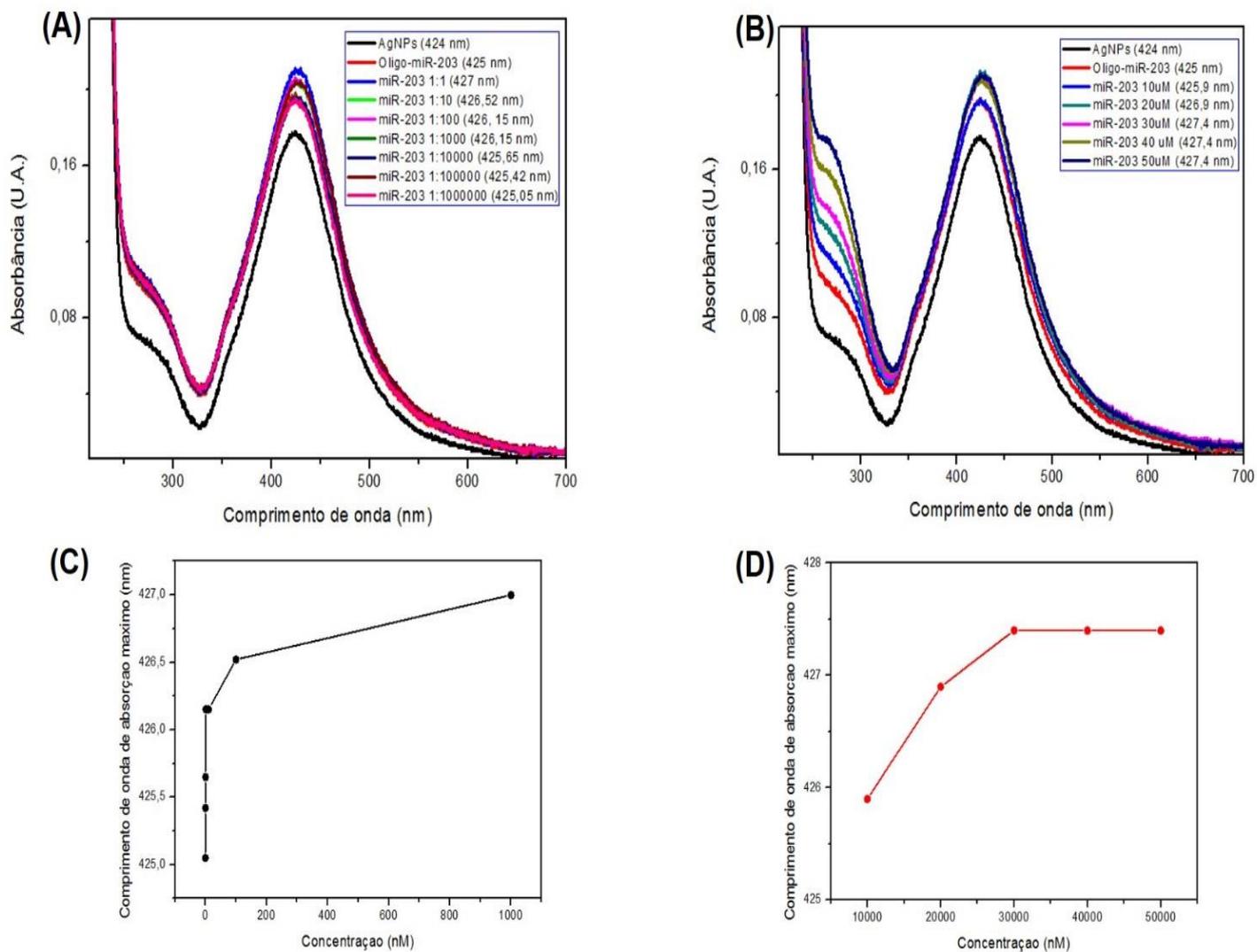
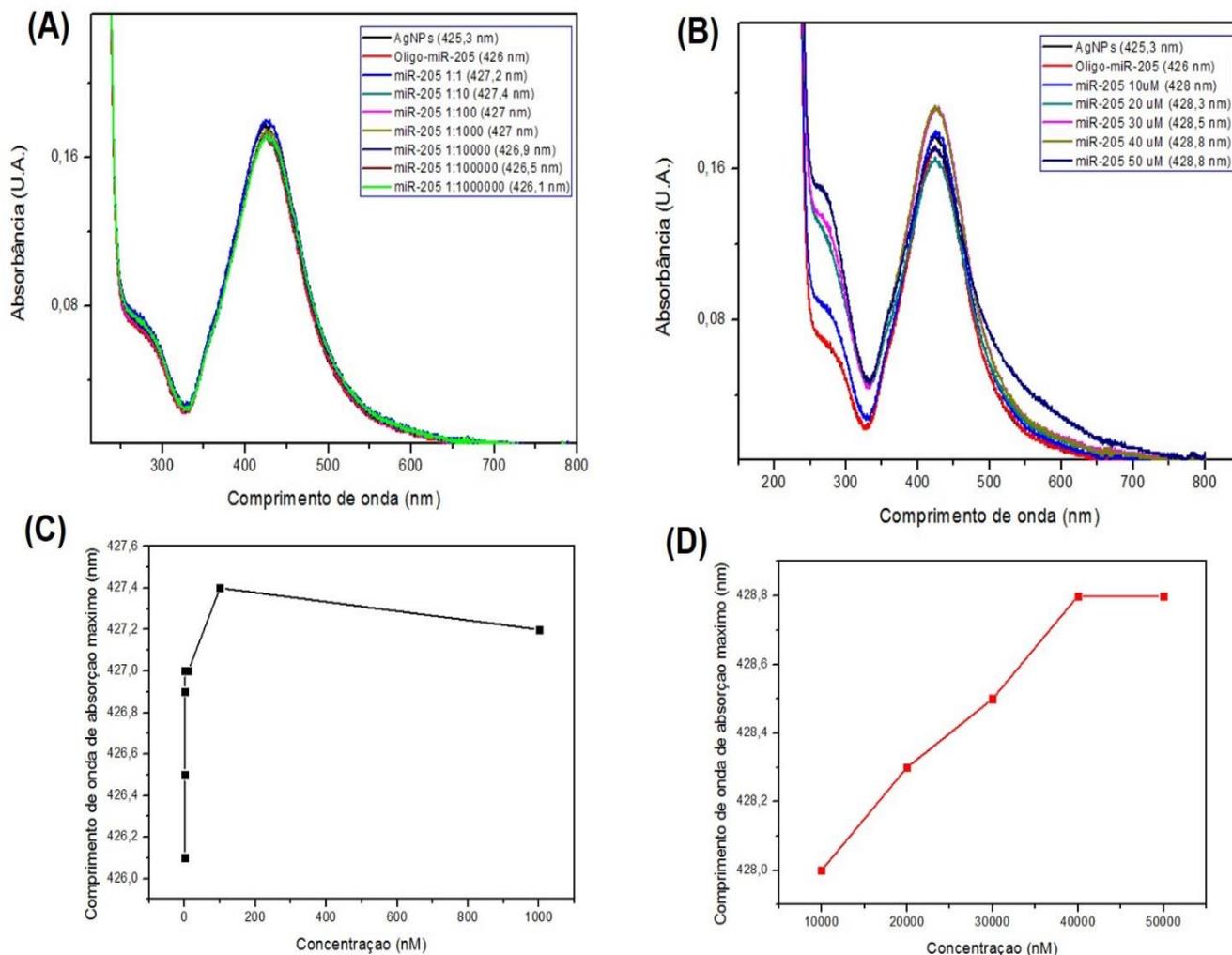


Figura 36 - Espectro UV-VIS da quantificação do limite mínimo (A) e máximo (B) do miR-205 mediada por AgNPs e variação do comprimento de onda de absorção máximo das AgNPs em interação com o miR-205 em diferentes concentrações. Comprimento de onda da variação máxima da absorbância das AgNPs modificadas (C) em interação com miR-205 em diferentes concentrações na faixa de 0,001 a 100 nM. (D) em interação com miR-205 em diferentes concentrações na faixa de 10000 a 50000 nM.



Como apresentado anteriormente, esse deslocamento é proveniente da formação de aglomerados das nanopartículas metálicas (SHIPWAY; KATZ; WILLNER, 2000). E essa aglomeração mostrou-se diretamente proporcional ao aumento da quantidade de miRs na suspensão. Tal resposta exibida pelas AgNPs modificadas pode ser importante para determinar a progressão da patologia (RAJ *et al.*, 2014).

Desse modo, tanto o estudo feito por espectroscopia UV-Vis quanto aquele realizado por espectroscopia na região do infravermelho mostrou que o uso de AgNPs é eficaz no que se refere ao reconhecimento de biomarcadores moleculares, mais especificamente, no reconhecimento de microRNAs para detectar o CECP.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados, o formato esférico e o diâmetro médio revelado a partir da caracterização das AgNPs por meio da técnica de AFM proporcionou o delineamento de protocolos de imobilização de biomoléculas em AgNPs para estudos biomédicos, envolvendo a detecção de microRNAs específicos do CECP. Sendo as partículas produzidas na síntese 2 mais efetivas nesse processo, devido à sua alta compatibilidade de tamanho com as biomoléculas investigadas.

Constatou-se ainda que partir da identificação de grupos químicos e o estudo dos espectros de absorvância plasmônica da suspensão de AgNPs pelas técnicas de FTIR e espectroscopia UV-Vis, respectivamente, que o protocolo três foi efetivo na imobilização de oligo-miRs na superfície das AgNPs.

A hibridização com o miR específico pode ser comprovada pela variação da absorvância plasmônica e pelo valor de fwhm observado em cada etapa realizada neste trabalho (síntese, imobilização e interação). Além disso, a identificação de grupos químicos específicos também efetivou a confirmação das etapas de construção do sensor e de detecção dos alvos.

Com a interação inespecífica, foi possível comprovar a especificidade do conjugado AgNP-oligo-miR pelo seu microRNA correspondente.

Desse modo, a utilização de AgNPs revelou um grande potencial de sensoriamento prático e rápido de microRNAs, uma vez que a interação específica dos oligo-miRs com os microRNAs proporcionou uma variação na coloração da suspensão coloidal que foi detectada a olho nu.

Além do mais, a sensibilidade apresentada por tais partículas, no reconhecimento de microRNAs específicos à neoplasia de cabeça e pescoço pode contribuir para melhorar de forma significativa as técnicas de diagnósticos do CECP.

Os resultados mostraram, portanto, que o objetivo geral do trabalho foi atingido.

7 PERSPECTIVAS

A inovação deste trabalho está contida no desenvolvimento de uma perspectiva diagnóstica para detectar a neoplasia maligna de cabeça e pescoço em estágios iniciais. *A priori*, o trabalho utiliza-se de amostras comerciais, contudo, como perspectiva, pretende-se no futuro expandir tal estudo utilizando-se de amostras reais de pacientes acometidos pelo CECP. Além disso, pretende-se também expandir o uso do dispositivo construído para outras doenças como, por exemplo, no diagnóstico inicial da esclerose múltipla.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. et al. Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2000. Immunity to tumors; p.384-403.

AGNIHOTRI, S. et al. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. RSC Adv. 2014;4(8):3974–83.

AGNIHOTRI, S. et al. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. RSC Adv. 2013; 5, 7328-7340.

AKAGI, K. et al. Involvement of toxicity as an early event in urinary bladder carcinogenesis induced by phenethyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, and analogues in F344 rats. Toxicologic pathology. 2003; 31(4): 388–96.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A. et al. Biologia Molecular da Célula. 3 ed. Artemed, Porto Alegre, 2011.

ALEXANDROV, L. B. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human câncer. Science. 2016; 354(6312): 618-622.

ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. Mutation Research. 2011; 717(1–2): 1-8.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004; 431: 350-355.

ANDRADE, P. F. Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e nanocompósitos poliméricos antimicrobianos. 2013. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

ARGIRIS, A. et al. Head and neck câncer. The Lancet. 2008; 371: 1965-1709.

ARUNRUT et al. Sensitive Visual detection of AHPND Bacteria Using loop-mediated isothermal amplification combined with DNA-functionalized gold nanoparticles as probes. Plos one. 2016; 11 (3).

AXTEL, M. J. et al. Beyond secondary structure: Primary-sequence determinants license primiRNA hairpins for processing. Cell. 2013; 152(4): 844-858.

BABIC, B. et al. Minimising the effect of nanoparticle deformation in intermittent contact amplitude modulation atomic force microscopy measurements. J Appl Phys. 2016;119(21):214307.

BALLOTTIN, D. P. M. Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecidos antimicrobianos (2014). Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol.* 2014; 1170: 29-40.
- BARRAT, G. Colloidal drug carriers: Achievements and perspectives. *Cellular and Molecular Life. Science.* 2003; 60: 21-37.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116(2): 281-297.
- BASERGA, R. The relationship of the cell cycle to tumor growth and control of cell division: A review. *Cancer Research.* 1965; 25: 581-95.
- BASTÚS, N.G. et al. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. *Chem Mater.* 2014;26(9):2836–46.
- BHARGAVA, E. K. et al. Diagnostic Efficacy of Computed Tomography in Detecting Cervical Metastases in Clinically N0 Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery: official publication of the Association of Otolaryngologists of India.* 2016; 68(1): 25-9.
- BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune scape: A comprehensive review. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 2014; 10(1); 41-62.
- BIANCONI, E. et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann. of Human Biology.* 2013; 40(6): 463-471.
- BRAMBILLA, G; MARTELLI, A. Uptade on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed Pharmaceuticals. *Mutation Research.* 2009; 681: 209-229.
- BRANDL, D.W.; MIRIN, N. A.; NORDLANDER, P. Plasmon Modes of Nanosphere Trimers and Quadrumers, *J. Phys. Chem. B,* 2006, 110, 25, 12302–12310.
- BEACHY, P. A. et al. Mending and malignancy. *Nature* 2004; 431:402.
- BECKER, C. E. Utilização da curva de Melting como screening para análise dos genótipos A, D e F do vírus da Hepatite B em pacientes de um Hospital Geral do Sul do Brasil (2012). Tese de doutorado, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
- BEHERA, S. et al. UV-Visible spectrophotometric method development and validation of assay of paracetamol tablet formulation. *J. Anal Bioanal Techniques.* 2012: 3-6.
- BERNIER, J. et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head & neck.* 2005; 27: 843-850.
- BLOT, W. J. et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer research.* 1988; 48: 3282-3287.

BORASE, H. P. et al. Bio-Functionalized Silver Nanoparticles: a Novel Colorimetric Probe for Cysteine Detection. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015;(2015):3479–93.

BOREK, C. Molecular mechanisms in cancer induction and prevention. *Environmental Health Perspectives Supplements.* 1993; 101(3): 237-245.

BORGHEI, Y. S. et al. Visual detection of cancer cells by colorimetric aptasensor based on aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization. *Anal. Chem. Acta.* 2016; 904: 92-97.

BROOKS, S. A. et al. Molecular interactions in câncer cell metastasis. *Acta Histochemica.* 2010; 112 (1): 3-25.

BUSHAN, B. *Springer Handbook of Nanotechnology.* First Edition, New York, Springer Verlag, 2004.

CALDART et al. Phylogenetic Analysis Basic Concepts and its use as a tool for virology and molecular epidemiology. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2016; 44: 1392.

CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002; 99(24): 15524–15529.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTI, V. Nanotechnology in medicine: concepts and concerns. *Química Nova.* 2014; 37(3): 521–526.

CAPPELLESSO, R. et al. The prognostic role of the epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and Slug in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology,* v. 67, n. 4, p. 491–500, out. 2015.

CARLES, M.; HERMOSILLA, L. O futuro da medicina: nanomedicina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.* 2008; 5(10): 1–7.

CARVALHO, A.C. et al. Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Med.* 2015; 13: 1-14.

CASTILHO, M. L. et al. Simulação do espectro de absorção de nanopartículas de ouro e prata através da teoria de Mie. XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2010.

CAZAP, E. et al. Structural barriers to diagnosis and treatment of cancer in low-and middle-income countries: The urgente need for scaling up. *J Clin Oncol.* 2016; 34(1): 14-19.

CENNAME, N. et al. Low Cost Sensors Based on SPR in a Plastic Optical Fiber for Biosensor Implementation. *Sensors* 2011, 11(12), 11752-11760.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011; 331(6024): 1559-1564.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 2010;28(11):580-8.

CHAN, K. C. et al. Analysis of plasm Epstein-Barr Virus DNA no screen for nasopharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377: 513-522.

CHATTERJEE et al. MicroRNAs in cancer: Challenges and opportunities in early detection, disease monitoring, and therapeutic agents. *Curr. Pathobiol. Rep.* 2017; 5(1): 35-42.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; ANDERSON, W. F.; GILLISON, M.L. Incidence trends for human papillomavirus-related and unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008; 26, 612-619.

CHRISNASARI, R. *et al.* Development of DNA biosensor based on Silver nanoparticles UV-VIS absorption spectra for *Escherichia coli* detection. *International conference on Biological Sciences.* 2013, 382-389.

CLAPP, R. W.; GENEVIEVE, K. H.; MOLLY, M. J. Environmental and occupation causes of cancer: A call to act on what we know. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2007; 61(10): 631-639.

CHEN, R. et al. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57:93-107.

COGLIANO, J. V. Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute.* 2011; 103(24): 1827-1839.

CONNOR, J. Alcohol consumption as a cause of cancer. *Addiction.* 2017; 112(2): 222-228.

COSTA, P. R Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro como feramenta terapêutica e diagnóstica. 2012. Dissertação (mestrado) – Instituto de ciência e tecnologia das radiações, minerais e materiais, Comissão Nacional de Energia Nuclear.

Cure Rates are better for people whostop smoking during the radiation. *Years JCO.* 2012; 30(17): 2102- 2111.

DAKUBO, G. D. et al. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Int.* 2007;7:2.

DEKA, J. et al. Surface passivation improves the synthesis of high stable and specific DNA-functionalized gold nanoparticles with variable DNA density. *ACS appl. Mater. Interfaces.* 2015; 7: 7033-7040.

DEVI, P. U. Basics of carcinogenesis. *Health Administration.* 2004; 15(1): 16-24p.

D'SOUZA, G.; AGRAWAL, Y.; HALPERN, J.; BODISON, S.; GILLISON, M.L. Oral

sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2009; 199: 1263-1269.

DER JEAN, R. et al. Functionalized Silica Nanoparticles by Nanometallic Ag Decoration for Optical Sensing of Organic Molecule. *J. Phys. Chem. C*, 2010, 114 (37), pp 15633–15639.

DIAS, F.L. et al. (2001). Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cellcarcinomas of the tongue and floor of the mouth. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 125, 23-29.

DITHIOL (DTPA) LINKER – Biosynthesis. Disponível em: [https://www.biosyn.com/oligonucleotideproduct/dithiol-linker-\(dtpa\)-oligonucleotide-modification.aspx](https://www.biosyn.com/oligonucleotideproduct/dithiol-linker-(dtpa)-oligonucleotide-modification.aspx). Acesso em: 12 Jul. 2018.

DITHIOL LINKER – Trilink Biotechnologies. Disponível em: <https://www.trilinkbiotech.com/cart/scripts/prodView.asp?idproduct=6016>. Acesso em: 15 Jul. 2018.

DO-WALDEN, M. J.; MD-AYGUN, N. Head and neck cancer. *Seminars in Roentgenology*. 2013; 48(1): 75-86.

DUVVURI, U. et al. (2004). Elective neck dissection and survival in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *The Laryngoscope* 114, 2228-2234.

EASTOE, J.; HOLLAMBY, M. J.; HUDSON, L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006, 128, 5.

EIGLER; D. M; SCHWEIZER; E. K. Positioning single atoms with a scanning tunneling microscope. *Nature*. 1990; 344: 524-526.

EL BADAWEY, A.M. et al. The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Sci Total Environ*. 2012;429:325–31.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. Oncomirs – MicroRNAs with a role in câncer. *Nature*. 2006; 6: 259-269.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001; 411: 342-348.

EYHOLZER, M. et al. Complexity of miR-223 regulation by CEBPA in human AML. *Leukemia Research*, v. 34, n. 5, p. 672–676, maio 2010.

EYERICH, S. et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119:3573-85;

FELLIPI, C. Esmaltes e Nanotecnologia. Disponível em: <http://entendendocosmetologia.blogspot.com.br/>. Acesso em: 14 Jul. 2018.

FERLAY, J. Estimates of world wide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127(12): 2893-917.

FERLITO, A. et al. (2006a). Neck dissection: past, present and future? *The Journal of laryngology and otology* 120, 87-92.

FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*. Caltech. 1960; 23(5): 22–36.

FIDLER, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews Cancer* 3, 453-458.

FRANK, A. S.; IWASA, Y.; NOWAK, M. A. Patterns of cell division and the risk of câncer. *Genetics*. 2003; 163: 1527-1532.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009; 19(1): 92-105.

FROST, M. S; DEMPSEY, M. J; WHITEHEAD. The response of citrate functionalized gold and silver nanoparticles to the addition of heavy metal ions. *Colloids and Surfaces A Physicochem. Eng. Aspects*. 2016.

GAO, G. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*, Copyright by Imperial College Press 2004.

GAO, J. et al. Coloidal stability of gold nanoparticles modified with thiol compounds: Bioconjugation and application in cancer cell imaging. *Langmuir*. 2012; 28(9): 4464-4471.

GARCIA, M. V. D. Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. 2011. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas.

GARCÍA-BARRASA, J.; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA, J.; MONGE M. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. *Open Chem*. 2011;9(1).

GARG, N. et al. Robust gold nanoparticles stabilized by trithiol for application in chemiresistive sensors. *Nanotechnology*. 2010 Oct 8;21(40):405501.

GIAU, V.V.; A.AN, S.S. Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*., v. 360, p. 141-152, 2016.

GILJOHANN, D. A.; SEFEROS, D. S.; DANIEL, W.L.; MASSICH, M. D.; PATEL, P. C.; MIRKIN, C. A. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angew Chemie Int Ed*. 2010;49(19):3280–94.

GILLIMORE, A. M.; SIMON, A. K. Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. *Oncogene* 2008; 27:5886-93.

- GORUP, L. F. Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos. Dissertação de Mestrado, IQ-UFSCar, p. 1–142, 2010.
- GORUP, L. F. et al. Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *Journal of colloid and interface science*, v. 360, n. 2, p. 355–8, 15 ago. 2011.
- GRANDI, C. et al. (1985). Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas: therapeutic implications. *Head & neck surgery* 8, 67-73.
- GREGORY, P. A. et al. (2008a). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology* 10, 593-601.
- GRUPTA, G.P.; MASSAGUE, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.
- HADDAD, R.; ANNINO, D.; TISHLER, R.B. Multidisciplinary approach to cancer treatment: focus on head and neck cancer. *Dental clinics of North America*. 2008; 52(2): 1-17.
- HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS. HCB. Câncer de cabeça e pescoço, 2016. Disponível em: <<https://www.hcancerbarretos.com.br/cancer-de-cabeca-e-pescoco>>. Acesso em: 09 Jul. 2018.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.
- HANASH, S. M.; BAIK, C. S.; KALLIONIEMI, O. Emerging molecular biomarkers-bloodbased strategies to detect and monitor câncer. *Nature*. 2011; 8: 142-150.
- HANNICKEL, A. et al. Image J como ferramenta para medida da área de partículas de magnetita em três escalas nanométricas. 2012. Instituto militar de Engenharia do Rio de Janeiro.
- HARMEY, J. H. et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer* 2002; 101:415-22.
- HEAD AND NECK CANCERS – National Cancer Institute. Disponível em: <http://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>>. Acesso em: 01 Jul. 2018.
- HEO, J. H. et al. Stability of a gold nanoparticle-DNA system in seawater. *Journal of nanoscience and Nanotechnology*. 2013; 13: 7254-7258.
- HERCEG, Z. Epigenetics and cancer: Towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis*. 2007; 22(2): 91-103.
- HONG, L. U. et al. DNA-gold nanoparticle network based electrochemical biosensors for DNA MTase activity. *Talanta*. 2016; 152: 228-235.

HOO, C. M. et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J Nanoparticle Res.* 2008;10(S1):89–96.

HORNBERG, J. J. et al. Cancer: A systems biology disease. *Biosystems.* 2006; 83(2-3): 81-90.

HOWES, P. D.; RANA, S.; STEVENS, M. M. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. *Chem Soc Rev.* 2017;43(11):3835–53.

HUNT, T; NASMYTH, K.; NÓVAK, B. The cell cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011; 366 (1584):3494-7.

HURST, D. R.; EDMONDS, M. D; WELCH, D. R. MetastamiR: The field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Research.* 2009; 69(19):7495-7498.

IBRAHIM, R. K. et al. Environmental application of nanotechnology: air, soil, and water. *Environmental science and pollution research international.* 2016.

INCA - Fisiopatologia do câncer. Políticas Públicas de Saúde. A situação do Câncer no Brasil. Cap. 2, s.d. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>>. Acesso em: 07 Jul. 2018.

_____. As profissões e o câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/4ea0ac004eb693bb8a669af11fae00ee/vigilancia_rc17.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 07 Jul. 2018.

IRAVANI, S.; KORBKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V.; ZOLFAGHARI, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci.* 2014;9(6):385–406.

JACKSON, D.G. Lymphatic markers, tumour lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Cancer Treatment and Research.* 2007; 135: 39-53.

JEMAL, A. et al. The cancer atlas. American Cancer Society. 2014; 2: 1-136.

JIANG, W. et al. Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible. *J Magn Magn Mater.* 2004;283(2–3):210–4.6639-6647.

JIANG, X. C. et al. Role of Temperature in the Growth of Silver Nanoparticles Through a Synergetic Reduction Approach. *Nanoscale Res Lett* 2011, 6:32.

JOHNSON, S. R.; EVANS, S. D; BRYDSON, R. Influence of a terminal functionality on the physical properties of surfactant-stabilized gold nanoparticles. *Langmuir.* 1998; 14:

JÚNIOR, R. G. A. Temperatura de Melting: Um estudo comparativo. 2010. Monografia, Faculdade de Computação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KAGESHITA, T. et al. Downregulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol* 1999; 154:745-54.

KANE, S. V.; GUPTA, M.; KAKADE, A. C.; A, D.C. Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2006; 32: 795-803.

KANWAL, R. et al. MicroRNAs in prostate cancer: Functional role as biomarkers. *Cancer Letters*. 2017, 407: 9-20.

KASTRATI, P. D. Impact of food components and digestive enzymes on silver nanoparticles cytotoxicity in a coculture model of the intestinal barrier. *Année académique* 2018.

KATZ, E.; SHIPWAY, A. N.; WILLNER, I. Biomaterial-Nanoparticle Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications. In: SCHMID, G. (Ed.). *Nanoparticles*. [s.l.] WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003; 368–421.

KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A. et al. Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. *Analytical chemistry*, v. 82, n. 15, p. 6401–8, 1 ago. 2010.

KIM, M. I.; SHIM, J.; LI, T.; LEE, J.; PARK, H. G. Fabrication of Nanoporous Nanocomposites Entrapping Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles and Oxidases for Colorimetric Biosensing. *Chem - A Eur J*. 2011;17(38):10700–7.

KIMLING, J. et al. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B.*, 2006, 110, 15700-15707.

KORA, A.; BEEDU, S.; JAYARAMAN, A. Size-controlled green synthesis of silver nanoparticles mediated by gum ghatti (*Anogeissus latifolia*) and its biological activity. *Org Med Chem Lett*. 2012;2(1):17.

KRESTY, L. A.; MALLERY, S.R.; KNOBLOCH, T. J., SONG, H.; LLOYD, M.; CASTO, B.C. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res*. 2002; 62: 5295-5300.

KRUTYAKOV, Y.A. et al. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russ Chem Rev*. 2008;77(3):233–57.

KUDO, Y. et al. Establishment of an oral squamous cell carcinoma cell line with high invasive and p27 degradation activities from a lymph node metastasis. *Oral Oncology*, v. 39, n. 5, p. 515–520, jul. 2003.

KWONG, D. et al. (1994). The effect of loco-regional control on distant metastatic dissemination in carcinoma of the nasopharynx: an analysis of 1301 patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 30, 1029-1036.

LAI, Z. C. et al. Control of cell proliferation and apoptosis by p53 as tumor suppressor, *Mol. Cell.* 2005; 120(5): 675-85.

LAIDLER, K.J. *The world of physical chemistry*. Oxford: Oxford University Press, 1993, 292.

LEE, E. V. H. P.; MULLER, W. J. *Oncogenes and tumor suppressor genes*. Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.* 2010; 2(10): a003236.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-Enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* 1982; 86: 3391-3395.

LEERMAKERS, F.; ERIKSSON, J. C.; LYKLEMA, H. Association Colloids and their Equilibrium Modelling. In: Lyklema J, editor. *Fundamentals of Interface and Colloid Science*. 1st Edition. London: Elsevier Academic Press; 2005. p. 4.1-4.123.

LENA, A. M. et al. miR-203 represses "stemness" by repressing $\Delta Np63$. *Cell Death & Differentiation*, v. 15, n. 7, p. 1187-1195, 16 maio 2008.

LI, F. et al. Thermal stability of DNA functionalized gold nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* 2013; 24:1790-1797.

LIEPOLD, P. et al. Electrically detected displacement assay (EDDA): a practical approach to nucleic acid testing in clinical or medical diagnosis. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Jul; 391(5):1759-72.

LIM, S.C. et al. (2004). Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 166-172.

LIN, P. C.; LIN, S.; WANG, P. C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv.* 2014;32(4):711-26.

LINK, S.; EL-SAYED, M.A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J Phys Chem B.* 1999;103(21):4212-7.

LISMONT, M.; DREESEN, L. Comparative study of Ag and Au nanoparticles biosensors based on surface plasmon resonance phenomenon. *Mater Sci Eng C.* 2012;32(6):1437-42.

LO, K. M. et al. Monitoring of DNA-protein interaction with single gold nanoparticle by localized scattering plasmon resonance spectroscopy. *Methods.* 2013; 64: 331-337.

LÓPEZ-OTÍN, C.; MATRISIAN, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer.* 2007; 7(10): 800-808.

LU, Z. et al. Covalently linked DNA/protein multilayered film for controlled DNA release. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 314, n. 1, p. 80–88, 1 out. 2007.

LUDWIG, A. N.; GIEBEL, B.; Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Alemanha* v.44, p-11– 15, jan. 2012.

LUO, X. et al. MicroRNA-catalized cancer therapeutics based on DNA-programmed nanoparticle complex. *ACS Appl Mater Interface*. 2017; 9(39): 33624-33631.

MAASLAND, D. et al. Alcohol consumption, cigaret smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: Results from the Netherlands Cohort Study *BMC Cancer*. 2014; 14: 187.

MAAYAN, G.; LIU, L. K. “Silver nanoparticles assemblies mediated by functionalized biomimetic oligomers”. *Biopolymers*. 2011; 96 (5): 679-687.

MA, Y.; MACHESKY, L. M. Fascin1 in carcinomas: Its regulation and prognostic value. *International journal of cancer*, v. 137, n. 11, p. 2534–44, 1 dez. 2015.

MA, Q. et al. Serum microRNA-205 as a novel biomarker for cervical cancer patients. *Cancer Cell International*, v. 14, p. 81, 22 ago. 2014.

MACDONALD, H.; JERRIS, R. C.; BENNETT, J. PCR Fundamentals: Focus on Multiplex PCR Assay and the Advantages over Singleplex Assays. [s.l: s.n.].

MADRAS, G.; MCCOY, B. J. Distribution kinetics theory of Ostwald ripening. *Journal of Chemical Physics*. 2001; 115, 14-22.

MAHMOUDI, M.; LYNCH, I.; EJTEHADI, M. R.; MONOPOLI, M. P.; BOMBELLI, F. B.; LAURENT, S. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev*. 2011;111(9):5610–37.

MAIGA, A. W. et al. Timeliness of care and lung cancer tumor-stage progression: How long can we wait? *Ann Thorac Surg*. 2017; 104(6): 1791-1797.

MALHOTRA, J. et al. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur. Respir*. 2016; 48(3) 889-902.

MANSUR, A.; MANSUR, H.; GONZÁLEZ, J. Enzyme-polymers conjugated to quantumdots for sensing applications. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2011; 11(10):9951–72.

MAR-AGUILAR, F. et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. *Disease Markers*. 2013; 34(3): 163–169.

MARANGONI, V. S.; PAINO, I. M.; ZUCOLOTTO, V. Synthesis and characterization of jacalin-gold nanoparticles conjugates as specific markers for cancer cells. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 2013; 112: 380–6.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*. 2015; 349(6255): 1483-1489.

MARTIN-PRESTON, S. et al. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Research*. 1990; 50: 7415-7421.

MARZÁN, M. L. "Nanometals: formation and color", *Materials Today*, 2004, 26,32-41.

MASO, L. D. et al. Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: A re-analysis of case-control studies using bi-dimensional spline models. *European Journal of Epidemiology*. 2016; 31 (4): 385-393.

MASOUDI, S. et al. A new approach to survival analysis of head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of Iranian Medicine*, 2017; 20(8): 503-510.

MATHEWS, M.; BULMAN, D.; RYAN D. The role of patient and physician advocacy in reducing wait times for cancer care: a qualitative analysis. *CMAJ Open*. 2017; 5(4):773-778.

MEKHALIF, Z.; FONDER, G.; AUGUSTE, D.; LAFFINEUR, F.; DELHALLE, J., "Impact of the anchoring groups X (-SH, -S-S-, -SeH and -Se-Se-) of CF₃(CF₂)₃(CH₂)₁₁X molecules self-assembled on oxidised electroplated copper", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2008, 618, 24-32

MCFARLAND, A. D.; VAN DUYN, R. P. Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity. *Nano Lett*. 2003;3(8):1057-62.

MCKENNA, D. J. et al. MicroRNA 203 Expression in Keratinocytes Is Dependent on Regulation of p53 Levels by E6. *Journal of Virology*, v. 84, n. 20, p. 10644-10652, 15 out. 2010.

MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105(30): 10513-10518.

MITTELMAN, A. M. et al. Effects of ultraviolet light on silver nanoparticle mobility and dissolution. *Environ Sci Nano*. 2015;2(6):683-91.

MOCK, J. J.; BARBIC, M.; SMITH, D. R.; SCHULTZ, D. A.; SCHULTZ, S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J Chem Phys*. 2002;116(15):6755.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer science* 98, 1512-1520.

MULLER, P. A. J; VOUDEN, K. H. p53 mutations in cancer nature cell biology. 2013; 15: 2-8.

NGHIEM, T. H. L. et al. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2010;1(2):1-5.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. Hibridização *in situ* Fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.79, n.4, p.627-632, out./dez., 2012.

NICASIO-COLLAZO, L. A. et al. Stress-induced DNA damage: a case study in diffuse large B-cell lymphoma. Journal of the Royal Society, Interface, v. 11, n. 100, p. 20140827, 6 nov. 2014.

OBAYASHI, M. et al. microRNA-203 suppresses invasion and epithelial-mesenchymal transition induction via targeting NUA1 in head and neck cancer. Oncotarget, v. 7, n. 7, p. 8223–8239, 16 fev. 2016.

OLIVEIRA, D. A. Interação de metaloporfirinas com DNA: mecanismo catalítico da fotoclivagem. 2017. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, P. A et al. Chemical carcinogenesis. Annals of the brazilian academy of sciences. 2007; 79(4): 593-619.

OLSON, P. et al. MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer. Genes & Development. 2009; 23(18): 2152-2165.

ORGANIZATION, W. H.; SAFETY, I. P. ON C. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. 1993.

OUYANG, L. Programmed cell death pathways in câncer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Proliferation. 2012; 45(6): 487-498.

PARAMELLE, D. et al. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. Analyst. 2014; 139, 4855.

PATIL, R. M. et al. Superparamagnetic core/shell nanostructures for magnetic isolation and enrichment of DNA. RSC Adv. 2015.

PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2016; 1:15004.

PEREIRA, M. C. et al. Sporadic and multiple neurofibromas in the head and neck region: a retrospective study 33 years. Clin Oral Invest. 2007; 11: 165-169.

PEREIRA, A. R.; CRESPILO, F. N. Estudo cinético de formação de nanopartículas de paládio na presença da enzima glucose oxidase. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Lindóia, 33ªSBQ, 2010.

PETERSEN, P. E. Oral câncer prevention and control: The approach of the world health organization. Oral Oncology. 2009; 45(475): 454-460.

PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method?, J. Phys. Chem. B. 2004; 108: 945–951.

PITKETHY, M. J. Nanoparticles as building blocks? *Mater Today*. 2003;6(12):36-42.

PODLIPENSKY, A.; ABDOLVAND, A.; SEIFERT, G.; GRAENER, H. “Femtosecond laser assisted production of dichroitic 3D structures in composite glass containing Ag nanoparticles”, *Appl. Phys. A*, 2005, 80, 1647.

POGRIBNY, I. P. MicroRNAs as biomarker for clinical studies. *Exp. Biol. Med.* 2017; 0:1-8.

POPA, M. et al. Stable silver colloidal dispersions using short chain polyethylene glycol. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2007;303(3):184–90.

Processo de carcinogênese. Disponível em: <http://www.patoneoplasia.blogspot.com/2013/06/processo-de-carcinogenese.html>. Acesso em: 29 Jun. 2018.

POWRÓZEK, T. et al. Plasma circulating microRNA-944 and microRNA-3662 as potential histologic type-specific early lung cancer biomarkers. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, v. 166, n. 4, p. 315–23, out. 2015.

PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. J. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, v. 13, n. 4, p. 4811–40, 2013.

QIN, A.-Y. et al. MiR-205 in cancer: an angel or a devil? *European Journal of Cell Biology*, v. 92, n. 2, p. 54–60, fev. 2013.

RACHKOV, A. et al. Investigations of aggregation stability of gold nanoparticle at their interactions with compounds bearing thiol and/or amino functional groups. *Chemical Sensor*. 2014; 4:16.

RADHAKRISHNAN, S. et al. Gold nanoparticles functionalized poly(3,4-ethylenedioxythiophene) thin film for highly sensitive label free DNA detection. *Anal. Methods*. 2013; 5: 684.

RAJ, V. et al. Naked eye detection of infertility using fructose blue-A novel gold nanoparticle based fructose sensor. *Biosens. Bioelectron.* 2014;54:171–4.

RAMOS, L.C. Análise citogenética comparada em sisal entre o híbrido 11648 e agave sisalana perrine. 2014. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016; 148: 183-93.

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, nov. 2017.

RATYAKSHI, CHAUHAN. Colloidal Synthesis of Silver Nano Particles. *Asian J Chem.* 2009;21(10):113–6.

RAVINDRAN, A.; CHANDRAN, P.; KHAN, S. S. Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2013;105(2013):342–52.

RAWAL, R. M. et al. Tobacco habituated and non-habituated subjects exhibit different mutational spectrums in head and neck squamous cell carcinoma. *Biotech.* 2015; 5(5): 685-696.

RICE, J. et al. Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: A need for more precise standardization. *Surgery.* 2015; 158(5): 1345-1351.

ROCCO, J. W. et al. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, v. 9, n. 1, p. 45–56, 1 jan. 2006.

RODRIGUES, C. A. Aplicações de Processamento e Análise avançada de Imagens para Caracterização de Imagens de Microscopia de Força Atômica. 2003. Tese, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

ROMAGOSA, C. et al. p16lnk4a overexpression in câncer: A tumor supressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 2011; 30: 2087-2097.

ROSARIN, F. S.; MIRUNALINI, S. Nobel Metallic Nanoparticles with Novel Biomedical Properties. *J Bioanal Biomed.* 2011;3(4).

ROSI, N. L.; MIRKIN, C. A. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem Rev.* 2005;105(4):1547–62.

SANDOVAL, T. B. Análise da expressão de microRNAs e alvos candidatos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. p. 1–86, 2011.

SALVATI, E.; STELLACCI, F.; KROL, S. Nanosensors for early cancer detection and for therapeutic drug monitoring. *Nanomedicine (London, England).* 2015; 10(23): 3495-512.

SCHOREY, J, S; BHATNAGAR, S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *TRAFFIC, Estados Unidos*, v.9, p.871-881, jun.2008.

SEKHON, B. S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnol Sci Appl.* 2014;7:31–53.

SELINGER, B. et al. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000; 21:455-64.

SEYFRIED, T. N; HUYSENTRUYT, L. C. On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Onco.* 2013; 18(1-2): 43-73.

SHAH, P. et al. Design aspects of bright red emissive silver nanoclusters/DNA probes for microRNA detection. *ACS Nano.* 2012; 6(10): 8803-14.

SHAW, D.J.,” Introdução à química de colóides e de superfícies”. Trad. De J.H. Maar. São Paulo: Edgard Blucher/Edusp, 1975.

SHIPWAY, A. N.; KATZ, E.; WILLNER, I. Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications. *ChemPhysChem*. 2000;1(1):18–52.

SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 2002; 2(3): 210-219.

SILAHTAROGLU, A. N. et al. Detection of microRNAs in frozen tissue sections by fluorescence *in situ* hybridization using locked nucleic acid probes and tyramide signal amplification. *Nature Protocol*, v.2, n.10, 2007.

SILEIKAITE, A. et al. Investigation of silver nanoparticles formation kinetics during reduction of silver nitrate with sodium citrate. *Materials Science*, v. 15, n.1, 2009.

SINGH, N. A. Nanotechnology innovations, industrial applications and patents. *Environ Chem Lett*. 2017;1–7.

SMITH, E. M. et al. Complex etiology underlies risk and survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and alcohol: A case for multifactor disease. *J Oncol*, 2012 (2012), p. 571862.

SLAUGHTER, D.P. et al. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 1953;6:963-968.

SOLOMON, S. et al. Synthesis and study of silver nanoparticles. *EUA: Journal of Chemical Education*. 2007; 84(2): 322.

STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006; 12:895-904.

STRACHAN, T.; READ, A. *Genética Molecular Humana*. 4ª ed. Proto Alegre, 2013.

STEDWELL, N.; POLFER, C. Spectroscopy and the Electromagnetic Spectrum. In: Polfer NC, Dugourd P, editors. *Laser Photodissociation and Spectroscopy of Mass-separated Biomolecular Ions*. Gainesville, Florida: Springer International Publishing Swirzerland; 2013. p. 1–20.

SUHAG, V. et al. Disease characteristics and treatment attributes of patients admitted to the oncology Ward of a tertiary care government hospital. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2017; 13(1): 44-50.

SWINGER R.R.; TUCKER J.D. Fluorescence *in situ* hybridization: a brief review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.27, p.245-254, 1996.

SZABO et al., Treatment patterns and costs of care for patients with relapsed and refractory Hodgkin lymphoma treated with brentuximab vedotin in the United States: A retrospective cohort study. *Plos One*. 2017; 12(10): e0180261.

TAKES, R.P. (2004). Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: imaging techniques and biomarkers. *Oral Oncol.* 2004; 40: 656-667.

TALAMINI, R. et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer causes & control : CCC*, v. 13, n. 10, p. 957-64, dez. 2002.

TAN et al. Dual channel sensor for detection and discrimination of heavy metal ions based on colorimetric and fluorescence response of the AuNPs-DNA conjugates. *Biosensor and Bioelectronics.* 2016; 85: 414-421.

TANG, J. et al. Molecular mechanisms of microRNAs in regulating epithelial-mesenchymal transitions in human cancers. *Cancer Letters.* 2016; 371(2): 301-313.

TEPPO, H.; KOIVUNEN, P.; HYRYNKANGAS, K.; ALHO, O.P. Diagnostic delays in laryngeal carcinoma: professional diagnostic delay is a strong independent predictor of survival. *Head and Neck.* 2003; 25: 389-394.

TIAN, L. et al. Gold nanoparticles superlattices assembly for electrochemical biosensor detection of microRNA-21. *Biosens Bioelectron.* 2017, 99:564-570.

Thiol SS dipod (dithiol phosphoramidite (DTPA)) – Gene Link. Disponível em: http://www.genelink.com/newsite/products/mod_detail.asp?modid=99. Acesso em: 15 Jul. 2018.

TIMP, W.; FEINBERG, A. P. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nature Reviews Cancer.* 2013; 13: 497-510.

TRAN, M. N. et al. The p63 protein isoform $\Delta Np63\alpha$ inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n.5, p. 3275-3288, 1 fev. 2013.

TRAN, Q. H.; NGUYEN, V. Q.; LE, A-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* 2013;4(3):33001.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLER, S. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *J. Discuss. Faraday Soc.*, 1951, 11, 55.

TURKEVICH, J., *Colloidal Gold. Part I.* *Gold Bull.* 1985, 18, (3), 86-91.

ÜNER, M. Characterization and Imaging of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. In: Aliofkhazraei M, editor. *Handbook of Nanoparticles.* Istanbul: Springer International Publishing; 2016. p. 117-41.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, desregulation and therapeutic targets in câncer. *Cell Prolif.* 2003; 36(3): 131-49.

VICENTE-DUEÑAS, C. et al. Function of oncogenes in câncer development: A changing paradigma. *The EMBO I Journal*. 2013; 32: 1502-1513.

XU, J.; XIA, H.; LIU, H.; HU, Y., “Synthesis and optical properties of silver nanoparticles stabilized by gemini surfactant”, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2006, 273,179–183.

WANG, Q. et al. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan–mutiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker - *ScienceDirect. Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 156, n. 2, p. 599–605, ago. 2011.

WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *Journal of Cellular Physiology*. 2016; 231 (1): 25–30.

WEINBERG, R. A. *The Biology of Cancer*. Garland Science; New York: 2007. p. 796.

WIGGINS, J. F. et al. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Research*. 2010; 70(14): 5923-5930.

WHO. World Health Organization – Cancer, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 20 Jul. 2018.

WILLIAMS, G. H; STOEBER, K. The cell cycle and câncer. *J. Pathol*. 2012; 226(2): 352-64.

WILLNER, I.; WILLNER, B. Biomolecule-based nanomaterials and nanostructures. *Nano Lett*. 2010;10(10):3805–15.

WU, K. et al. Non-codingRNAsin cancer brain metastasis. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*. 2016; 8: 187-202.

YANG, W. et al. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology*. 2009; 2-8.

YANG, S. W.; VOSCH, T. Rapid detection of microRNA by a silver nanocluster DNA probe. *Anal. Chem*. 2011; 83: 6935-6939.

YASUN, E. et al. Cancer cell sensing and therapy using affinity tag-conjugated gold nanorods. *Interface Focus*. 2013;3(3):1–9.

YI, R. et al. A skin microRNA promotes differentiation by repressing “stemness”. *Nature*, v. 452, n. 7184, p. 225–229, 13 mar. 2008.

YIN, H. et al. Tridentate tripodal sulfur ligand as a stable molecular surface anchor for the fabrication of oligonucleotide-gold based label-free biosensors. *J Name*. 2013; 00: 1-3.

YOKOTA, J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):497–503.

YOU, J. et al. A microcantilever-based silver ion sensor using DNA-functionalized gold nanoparticles as a mass amplifier. *Nanotechnology*. 2017; 28, 245501.

YU, L. H; CHEN, Y. F. Concentration dependent thermophoretic accumulation for the detection of DNA using DNA-Functionalized nanoparticles. *Anal.Chem.* 2015; 87: 2845-2851.

ZARPELON, F. Preparação, Caracterização e Aplicação de Filmes Finos de PAH/PAA com Nanopartículas de Prata no Tratamento Microbiológico de Efluentes Industriais para Reuso. 2013. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.

ZAVESKY, L. et al. New perspectives in diagnosis of gynaecological cancers: Emerging role of circulating microRNAs as novel biomarkers. *Neoplasma*, v. 62, n. 4, p. 509–520, 2015.

ZHANG, D. Y; CHEN, S. X; YIN, P. Optimizing the specificity of nucleic acid hybridization. *Nat Chem*. 2012; 4(3): 208-14.

ZHANG, Z. et al. Potential Biomarkers in Diagnosis of Human Gastric Cancer. *Cancer Investigation*, v. 34, n. 3, p. 115–122, 2016.

ZHAO, Z.; WANG, H.; QIN, X., et al. “Self-assembled film of hydrophobins on gold surfaces and its application to electrochemical biosensing” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 71, 1, 1, 102-106.

ZHENG, J. et al. DNA-templated in situ growth of AgNPs on SWNTs: a new approach for highly sensitive SERS assay of miRNA. *Chem Commun*. 2015; 51(30):6552-5.

ZHOU et al. MicroRNAs: A novel potential biomarker for diagnosis and therapy in patients with non-small cell lung cancer. *Cell Prolif*. 2017.

APÊNDICE A - IMOBILIZAÇÃO ESPONTÂNEA ENTRE OS OLIGO-miRs TIOLADOS E AS AgNPs (TRATAMENTO 1)

Considerando a interação espontânea entre o enxofre e a superfície metálica das nanopartículas e, ainda, a forte ligação química estabelecida entre eles, nesse primeiro tratamento (protocolo 1), a imobilização das biomoléculas consistiu na mistura das amostras (oligo-miRs e AgNPs) (KAUSAITE-MINKSTIMENE *et al.*, 2010; PUTZBACH; RONKAINEN, 2013).

Com esse estudo, notou-se que não houve uma variação significativa nas propriedades ópticas das nanopartículas metálicas, uma vez que o espectro de absorção das AgNPs modificadas com os oligo-miRs permaneceu igual ao espectro plasmônico das AgNPs não modificadas em ambas as sínteses (Figura 37). Além do mais, não houve alteração na cor da suspensão coloidal (Figura 38).

Figura 37 - Espectro de absorvância plasmônica no UV-Vis das AgNPs. **Síntese 1:** (A) AgNPs não modificadas - linha preta e AgNPs modificadas com oligo-miR-203 - linha verde; (B) AgNPs não modificadas - linha preta e AgNPs modificadas com oligo-miR-205 - linha vermelha. **Síntese 2:** (C) AgNPs não modificadas - linha preta e AgNPs modificadas com oligo-miR-203 - linha verde; (D) AgNPs não modificadas - linha preta e AgNPs modificadas com oligo-miR-205 - linha vermelha.

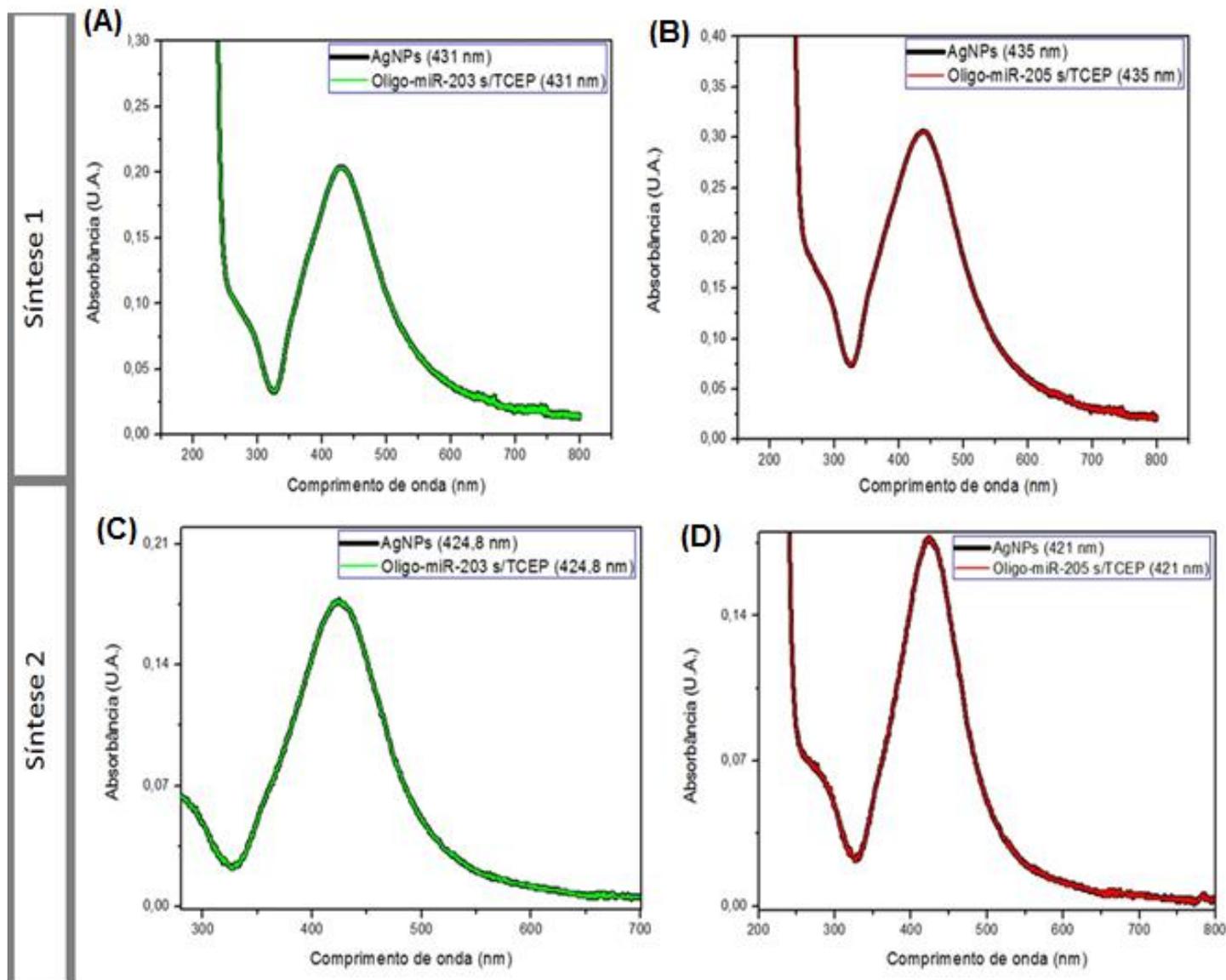
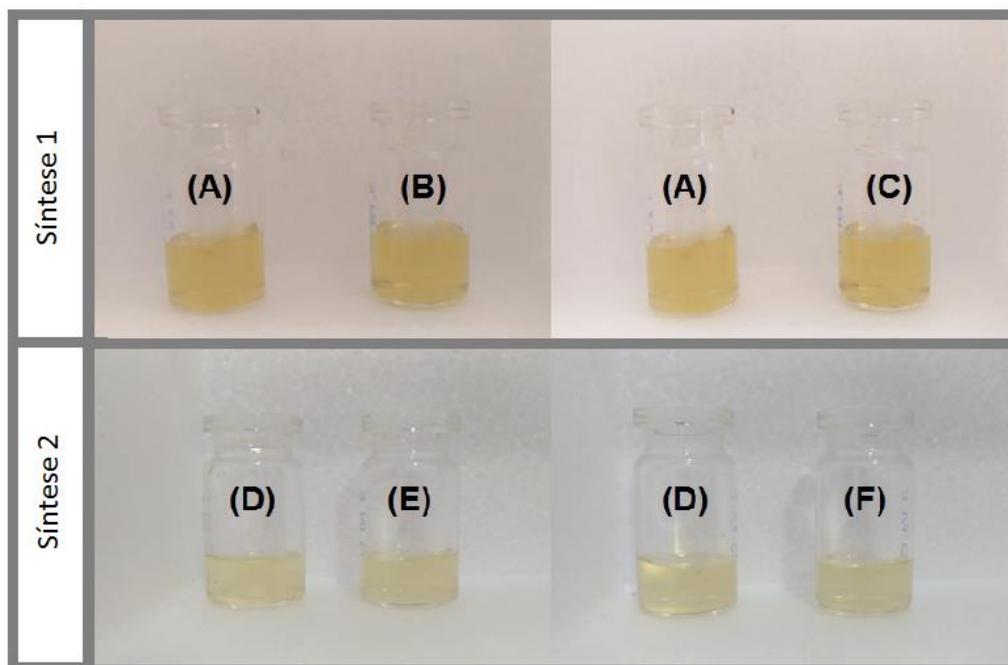


Figura 38 - Comparação entre a coloração das AgNPs antes da imobilização e após a imobilização proposta no protocolo 1. **Síntese 1:** (A) AgNPs, (B) imobilização do oligo-miR-203 e (C) imobilização do oligo-miR-205. **Síntese 2:** (D) AgNPs, (E) imobilização do oligo-miR-203 e (F) imobilização do oligo-miR-205.



APÊNDICE B - O EFEITO DO PH NA IMOBILIZAÇÃO DOS OLIGO-miRs NA SUPERFÍCIE DAS AgNPs (TRATAMENTO 2)

No segundo tratamento (protocolo 2), considerou-se que a não imobilização das biomoléculas foi proveniente da repulsão eletrostática decorrente das cargas negativas entre o grupo fosfato dos oligo-miRs e a monocamada iônica formada pelos íons citrato na superfície das partículas metálicas (ZARPELON, 2013).

Desse modo, a alteração do pH das suspensões coloidais poderia ser uma estratégia de modificação na organização dos íons citrato na superfície das AgNPs. Isso porque, em meios ácidos, a densidade da carga negativa desses íons é reduzida, o que minimiza os efeitos repulsivos entre os oligo-miRs e as AgNPs (ZARPELON, 2013).

Com esse teste, a estabilidade das AgNPs da síntese 1 e 2 foi afetada. Após 24h, as suspensões coloidais já apresentavam a aglomeração das partículas, inviabilizando a imobilização dos oligo-miRs e, conseqüentemente, a investigação espectral que comprovasse tal etapa. A aglomeração das AgNPs foi evidenciada pela presença da coloração acinzentada resultante da precipitação da prata (Figura 39).

Figura 39 - Diferença de cor das suspensões coloidais. **Síntese 1:** (A) AgNPs estáveis (B) AgNPs instáveis devido a modificação do pH. **Síntese 2:** (C) AgNPs estáveis (D) AgNPs instáveis devido a modificação do pH.

