

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES MICROFLUÍDICOS
DESCARTÁVEIS PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES VISANDO
O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tássia Regina de Oliveira*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

***bolsista FAPESP**

São Carlos - SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Tássia Regina de Oliveira, realizada em 25/03/2019:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
UFSCar

Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin
UNESP

Prof. Dr. Renato Sousa Lima
CNPEM

Prof. Dr. Bruno Campos Jahegitz
UFSCar

Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes
UFSCar

*Aos meus pais, José Roberto e Nelita, e ao meu esposo Gregory,
obrigada por me incentivarem a chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Roberto e Nelita, meu exemplo de dedicação e princípios, obrigada pelo amor, apoio, incentivo aos estudos e por nunca pouparem esforços para que eu chegasse até aqui. A minha irmã Flávia, minha parceira, que agora carrega o meu maior presente, obrigada pelo carinho, força e incentivo.

Ao meu esposo Gregory, por estar ao meu lado em todos os momentos, por acreditar em mim e me dedicar sua atenção e amor. Obrigada pelo incentivo em iniciar o doutorado, se hoje estou realizando essa conquista, é graças a você.

Aos meus sogros, cunhados, cunhada e sobrinhas, minha segunda família, agradeço pelo carinho, confiança e incentivo.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, que me orientou com paciência, animação, boas ideias e muita criatividade e conhecimento. Obrigada pela oportunidade e por dedicar seu tempo e ensinamentos a esse trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti pela oportunidade de trabalharmos juntas, pelas valiosas contribuições e discussões no desenvolvimento deste trabalho e por nos ceder as amostras de plasma dos idosos.

À Dra. Patrícia Regina Manzine Moralles, pelas contribuições no decorrer deste trabalho, sempre muito atenciosa em me ajudar com as dúvidas e interpretações dos resultados. Obrigada por realizar os ensaios de ELISA e WB e auxílio com os testes estatísticos.

Ao Prof. Dr. Marcio L. F. Balthazar e a MSc. Thamires N. C. Magalhães, obrigada por nos fornecerem as amostras de liquor e soro dos idosos e os resultados do método comparativo.

Aos Profs. Drs. Bruno Campos Janegitz, Fernando Cruz de Moraes, Maria Valnice Boldrin e Renato Sousa Lima, que participaram da minha banca avaliadora, obrigada pelas inúmeras e valiosas contribuições com este trabalho.

Aos amigos do LaBiE, Camila Erbereli, Camila Peverari, Camila Proença, Carolina, Diego, Grazi, Karla, Ricardo Alexandrino, Taíse, Tayane, Thaísa e Wilson. Obrigada pelas contribuições, discussões, apoio, pelos momentos de descontração e companhia no bom e velho café. Obrigada a aqueles que também, de alguma forma, colaboraram com as discussões científicas e nas atividades desenvolvidas durante esse trabalho. Em especial a Camila Peverari, que me ensinou os procedimentos do laboratório logo que eu cheguei e a Camila Erbereli, pela ajuda no início do desenvolvimento desse projeto. Aos amigos Grazi e Wilson, que tivemos a oportunidade de trabalharmos juntos em um projeto paralelo, obrigada pela troca de experiências, discussões, incentivo, risadas e por sempre me ajudarem a ver a vida por outros (bons e curiosos) olhos. Ao Diego e Carolina, parceiros que também tive a oportunidade de trabalhar em outros projetos, obrigada pela dedicação e experiências compartilhadas comigo.

Aos colegas do GQA e LABBES pela companhia e ajuda sempre que precisei.

Aos amigos do LERCI, grandes pessoas que tive a oportunidade de conhecer e conviver. Obrigada por me receberem tão bem, por ajudar nos momentos mais difíceis (e felizes também), pelas histórias, risadas e churrascos.

Aos amigos cuiabanos em Sanca, que me fazem sentir um pouco mais perto de casa, obrigada pelo apoio durante o doutorado e pelos momentos de descontração.

Aos amigos de longa data, conquistados durante minha caminhada, Fabi, Felipe, Rejane, We, Simone e Rosana, obrigada pela amizade, força e por acreditarem em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFSCar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
processo nº 2014/22401-0, pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram/participaram
dessa pesquisa.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ampére
Ab	Anticorpo
Ab ₁	Anticorpo monoclonal ou primário
Ab ₂	Anticorpo policlonal ou secundário
Ac	Antígeno
ADAM10	<i>A Disintegrin And Metallopeptidase 10</i>
ADI	<i>Alzheimer's Disease International</i>
AgAb	Complexo antígeno-anticorpo
APP	Proteína Precursora do Amiloide (do inglês <i>Amyloid Precursor Protein</i>)
AUC	Área sob a curva ROC (do inglês <i>area under the curve</i>)
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNPs-GSH	Nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona
BQ	Benzoquinona
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
CDR	Classificação Clínica de Demência (do inglês <i>Clinical Dementia Rating</i>)
CT	Grupo controle (idosos cognitivamente saudáveis)
DA	Doença de Alzheimer
DA1	Doença de Alzheimer leve
DA2	Doença de Alzheimer moderada
DA3	Doença de Alzheimer avançada
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
g	Gramma
GSH	Glutathiona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido ((N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2- etanosulfônico))
HQ	Hidroquinona
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
I	Corrente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Anticorpo de detecção Imunoglobulina G
K	Constante de equilíbrio
K _a	Constante de associação
K _D	Constante de dissociação
L	Litro
<i>LbL</i>	<i>Layer-by-layer</i>
LD	Limite de detecção
Log	Logaritmo
Luminex	Sistema de imunensaio multiplexado baseado em partículas magnéticas
m	Mili
MEEM	Mini Exame do Estado Mental
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
mol	Unidade de quantidade de matéria
MRI	Ressonância magnética
n	Nano

n	Réplicas
N_2	Gás nitrogênio
NHS	N-hidroxisuccinimida
NIA/AA	<i>National Institute on Aging and Alzheimer's Association Disease and Related Disorders Association</i>
p	Pico
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDDA	Poli(cloreto de dialildimetilamônio) (do inglês, <i>poly(diallyldimethylammonium) chloride</i>)
PEEK	Poliéter éter cetona (do inglês, <i>polyether ether ketone</i>)
PET	Tomografia de emissão de pósitrons
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Partícula magnética
PRP	Plasma rico em plaquetas
pTau	Proteína tau fosforilada
ROC	Característica de Operação do Receptor (do inglês <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>)
RSD	Desvio-padrão relativo (do inglês <i>relative standard deviation</i>)
SPCE	Eletrodos de carbono serigrafados (do inglês <i>screen-printed carbono electrode</i>)
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fótons
TNCL	Transtorno neurocognitivo leve
TNCLa	Transtorno neurocognitivo leve do subtipo amnésico
tTau	Proteína tau total
TW	Tween-20
V	Volt

β A	peptídeo β -amiloide
β A40	β -amiloide com 40 aminoácidos
β A42	β -amiloide com 42 aminoácidos
μ	micro (10^{-6})

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Coorte 1: Variáveis demográficas e clínicas dos sujeitos.	46
TABELA 3.2 - Coorte 2: Variáveis demográficas e clínicas dos sujeitos.	46
TABELA 4.1 - Imunossensores eletroquímicos para detecção de A β 42	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - a) Comparação entre um cérebro normal e com DA. Em cérebros com DA verifica-se o encolhimento do córtex e hipocampo e aumento dos ventrículos. b) As placas senis e emaranhados (mostrados nas regiões sombreadas em azul) tendem a se espalhar por todo o córtex de acordo com o avanço da doença. Fonte: Alzheimer's Association ¹⁵	2
FIGURA 1.2 - Esquema da estrutura multimodular da ADAM10. Créditos: Patrícia Regina Manzine Morales.....	8
FIGURA 1.3 - Esquema do imunoenensaio do tipo a) direto e b) indireto.....	10
FIGURA 1.4 - Esquema do imunoenensaio do tipo sanduíche.	12
FIGURA 1.5 - Esquema do imunoenensaio competitivo direto com a) antígenos imobilizados e anticorpo marcado e b) anticorpo imobilizado e o antígeno marcado. c) Esquema do imunoenensaio competitivo indireto com antígenos imobilizados e anticorpo secundário marcado.	13
FIGURA 1.6 - a) Esquema de detecção do analito utilizando um imunossensor convencional. b) Estratégia de detecção utilizando PMs conjugadas com dezenas de milhares de enzimas e anticorpos para amplificação do sinal analítico. Fonte: CHIKKAVEERIAH et al., 2011 ⁸⁷	20
FIGURA 3.1 - Sistema microfluídico acoplado ao multipotenciostato.	25
FIGURA 3.2 - Representação esquemática da fabricação dos eletrodos de trabalho, auxiliar e pseudo-referência: a e a') O vinil adesivo com o corte dos eletrodos são removidos com o auxílio de uma pinça; b e b') transferência do vinil para a folha de poliéster e aplicação de tinta de carbono; c) Remoção do adesivo vinílico e c') deposição da tinta de Ag/AgCl para produzir o eletrodo de pseudo-referência antes da remoção de vinil; d e d') Eletrodos de carbono e pseudo-referência impressos; e) Esquema representativo da construção do dispositivo microfluídico; f) Dispositivo microfluídico descartável com os conectores de entrada e saída da solução; g) foto do dispositivo.	27
FIGURA 3.3 – Esquema da síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona.	29
FIGURA 3.4 - Esquema das etapas de construção do imunossensor baseado no ensaio do tipo sanduíche.....	30
FIGURA 3.5 - Esquema da modificação dos eletrodos de trabalho por meio de filme LbL de PDDA e AuNPs-GSH e imobilização do covalente do Ab ₁ . a) Adição da solução de PDDA sobre a superfície do SPCE; b) Adição das AuNPs-GSH; c) Uma	

solução mista de EDC/NHS foi adicionada para ativação dos grupos carboxilas da GSH; d) Em seguida, uma solução do Ab₁ foi adicionada e deixada por aproximadamente 18h; d) Finalização do preparo do eletrodo com a adição de BSA para bloqueio dos sítios de ligação livres.....31

FIGURA 3.6 - Diagrama esquemático da modificação das PMs. a) PM comercial contendo grupo carboxila; b) PM foi ativada com EDC por 30 min; c) incubação com os Ab₂; d) após as etapas de lavagem, a PM foi modificada com enzimas HRP de modo a formar o bioconjugado HRP-PM-Ab₂.33

FIGURA 3.7 – Diagrama esquemático da magneto-captura do biomarcador ADAM10 na amostra utilizando bioconjugado HRP-PM-Ab₂: a) amostra contendo o biomarcador e os outros constituintes; b) adição das PMs modificadas; c) incubação para a captura do biomarcador pelos anticorpos; d) separação magnética das PMs contendo o bioconjugado, seguido da lavagem para eliminação dos interferentes; e) ressuspensão do bioconjugado em PBS contendo o biomarcador pré-concentrado.34

FIGURA 3.8 - Esquema da configuração do imunoensaio indireto para detecção do anticorpo anti-βA42 usando as PMs modificadas com o peptídeo.37

FIGURA 3.9 - Esquema da construção do imunossensor baseado no ensaio competitivo indireto usado para detecção as PMs decoradas com o anticorpo IgG e HRP (esquerda) ou o anticorpo IgG-HRP (direita).38

FIGURA 3.10 - Esquema da modificação dos eletrodos de trabalho por meio do filme *LbL* de PDDA e AuNPs-GSH e imobilização da βA42. a) Adição da solução de PDDA sobre a superfície do eletrodo de trabalho; b) Adição das AuNPs-GSH; c) Uma solução mista de EDC/NHS foi adicionada para ativação dos grupos carboxilas da GSH; d) Em seguida, uma solução de βA42 foi adicionada e deixada por aproximadamente 18h; d) Finalização do preparo do eletrodo com a adição de glicina para bloqueio dos sítios de ligação livres.....40

FIGURA 3.11 - Diagrama esquemático das etapas do ensaio competitivo indireto baseado no uso da a) IgG-PM-HRP e b) IgG-HRP.42

FIGURA 4.1 - Imagens de MEV do eletrodo de trabalho: a) SPCE sem modificação e modificados com: b) SPCE/PDDA e c) SPCE/PDDA/AuNPs. Inserção: imagens dos eletrodos antes e após as modificações tiradas com um microscópio óptico portátil digital. d) Imagem de MET das AuNPs-GSH.....49

FIGURA 4.2 - Representação esquemática do ciclo catalítico da enzima HRP na superfície do eletrodo modificado. HRP_{red} = enzima HRP reduzida (forma nativa), HRP_{ox} = HRP oxidada.51

- FIGURA 4.3 - Sinais transientes de corrente obtidos para a ADAM10 555 fg mL^{-1} e branco analítico por meio da solução carreadora de PBS-TW + BSA 0,1% com injeção de uma mistura H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Tempo de incubação de 30 min e potencial aplicado de $-0,25 \text{ V}$52
- FIGURA 4.4 - a) Sinais transientes de corrente obtidos para a ADAM10 555 fg mL^{-1} em diferentes vazões da solução carreadora PBS-TW + BSA 0,1% com injeção de uma mistura H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Tempo de incubação de 30 min e potencial aplicado de $-0,25 \text{ V}$. b) Gráfico das correntes resultantes da ADAM10 variando a vazão da solução carreadora em $50, 100$ e $200 \mu\text{L min}^{-1}$53
- FIGURA 4.5 - a) Sinais transientes de corrente obtidos para a ADAM10 555 fg mL^{-1} em diferentes tempos de incubação com injeção de uma solução mista de H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ e potencial de $-0,25 \text{ V}$. b) Gráfico das correntes resultantes variando o tempo de incubação do bioconjugado HRP-PM-Ab₁/ADAM10 no canal microfluídico.54
- FIGURA 4.6 - Sinais transientes para a ADAM10 555 fg mL^{-1} obtidos para um arranjo microfluídico de 8 eletrodos. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, potencial de $-0,25 \text{ V}$ e solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$55
- FIGURA 4.7 - a) Curva analítica para o biomarcador ADAM10 ($n \geq 5$). b) Respostas transientes de corrente obtidas para diferentes concentrações de ADAM10. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, potencial de $-0,25 \text{ V}$ e solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$56
- FIGURA 4.8 - Gráficos de barra para as concentrações obtidas da proteína ADAM10 em plasma humano determinadas usando o imunensaio proposto e o método comparativo ELISA. Resultados dos grupos a) CT, b) TNCL e c) DA.58
- FIGURA 4.9 - Diagrama de caixas para os níveis de ADAM10 encontrados no plasma humano dos sujeitos CT, com TNCL, DA1, DA2 e DA3, * $p < 0,05$59
- FIGURA 4.10 - Curvas ROC para detecção da ADAM10. Respostas para dos sujeitos controle vs. DA.60
- FIGURA 4.11 - Curvas ROC para detecção da ADAM10. Respostas de sujeitos controle vs. pacientes TNCL + DA.61
- FIGURA 4.12 - Diagrama de pontos dos níveis do biomarcador ADAM10 comparando, independentemente, o grupo controle com os diferentes estágios: a) grupo CT vs. TNCL, teste t $p = 0,03$; b) CT vs. DA1, teste t $p = 0,001$; c) CT vs. DA2, teste t $p = 0,003$; d) CT vs. DA3, teste t $p < 0,0001$62
- FIGURA 4.13 - a) Gráfico de barras com os níveis da proteína ADAM10 no liquor (barra azul) e soro (barras em vermelho) humano da coorte 2 usando o imunossensor

proposto. b) Diagrama de caixas para os níveis de ADAM10 encontrados no soro e liquor dos sujeitos CT, com TNCL e DA da coorte 2. Uma tendência no aumento dos níveis de ADAM10 com a progressão da doença foi observada em amostras de liquor (teste $t p = 0,18$) e soro (teste $t p = 0,04$) dos mesmos pacientes ($n = 10$).65

FIGURA 4.14 - a) Gráfico da variação da corrente monitorada após a interação de diferentes concentrações do anticorpo anti- β A42 com antígeno β A42 ($n \geq 5$). b) Isoterma de Langmuir linearizada para a interação anti- β A42/ β A42 obtida para o cálculo da K_a utilizando a equação 2. Inserção: aproximação da curva para os primeiros pontos da isoterma.....68

FIGURA 4.15 – Constantes de dissociação para diferentes proteínas-ligantes. Fonte: NELSON, D. L. & COX, M. M, 2008¹⁴⁴69

FIGURA 4.16 - Ilustração do imunoensaio competitivo direto para a detecção da β A42: a) estratégia de detecção baseada na modificação dos eletrodos com o peptídeo β A42 e incubação de uma solução contendo o peptídeo β A42 livre e as PMs conjugadas com o anticorpo e marcador eletroquímico e b) estratégia de detecção baseada na modificação dos eletrodos com anticorpos anti- β A42 e incubação do peptídeo β A42 livre e conjugado nas PMs com o marcador eletroquímico.71

FIGURA 4.17 - a) Respostas transientes de corrente para o branco e diferentes concentrações de β A42. Imunoensaio competitivo indireto com as PMs conjugadas com os anticorpos de detecção e enzimas HRP. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, potencial de $-0,25 \text{ V}$ e solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. b) Curva analítica para o biomarcador β A42 ($n \geq 5$).73

FIGURA 4.18 - a) Respostas transientes de corrente para o branco e diferentes concentrações de β A42. Imunoensaio competitivo indireto com anticorpo de detecção conjugado com a enzima HRP. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, potencial de $-0,25 \text{ V}$ e solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. b) Curva analítica para o biomarcador β A42 ($n \geq 5$).....74

FIGURA 4.19 – Comparação da sensibilidade analítica dos ensaios competitivo indireto para a detecção do biomarcador β A42 usando na detecção a IgG-PM-HRP (— com PM) e IgG-HRP (— sem PM).75

FIGURA 4.20 - Respostas transientes de corrente para o branco, padrão β A42 e amostras de paciente com DA e CT. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, potencial de $-0,25 \text{ V}$ e solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$77

FIGURA 4.21 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a) branco, padrão β A42 e amostras de paciente com DA e CT e b) diferentes amostras de paciente com DA e CT, injetando uma solução mista de H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Parâmetros da VC: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$78

- FIGURA 4.22 - Gráficos de barra para níveis do biomarcador β A42 em amostra de liquor humano analisados utilizando o imunoensaio proposto e uma plataforma Luminex[®]. Resultados dos grupos a) controle, b) com TNCL e c) com DA. 79
- FIGURA 4.23 - Diagrama de caixas para os níveis de β A42 encontrados no liquor humano dos sujeitos CT, com TNCL e DA, * $p = 0,0094$ 80
- FIGURA 4.24 - Curvas ROC para detecção do biomarcador β A42. Respostas de sujeitos controle vs. pacientes TNCL + DA. 81
- FIGURA 4.25 - Diagrama de pontos dos níveis do biomarcador β A42 para o grupo controle vs. doentes, teste t $p = 0,0061$ 82

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES MICROFLUÍDICOS DESCARTÁVEIS PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES VISANDO O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA DE ALZHEIMER. A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta um grande número de idosos e tem grande impacto social e econômico. Em estágios iniciais, o diagnóstico da DA pode melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Atualmente, os biomarcadores da DA requerem procedimentos de diagnóstico de imagem dispendiosos ou invasivos. Desta maneira, métodos que permitem um diagnóstico precoce, menos invasivo, rápido e de baixo custo são altamente desejáveis. Por esse motivo, foi desenvolvido um dispositivo microfluídico descartável baseado em imunossensores eletroquímicos para a detecção dos biomarcadores *A Disintegrin And Metalloprotease 10* (ADAM10) em plasma e peptídeo β -amiloide com 42 aminoácidos (β A42) em liquor. Amostras de três grupos de idosos divididos em sujeitos cognitivamente saudáveis, pacientes com transtorno neurocognitivo leve (TNCL) e com DA em diferentes estágios foram analisadas. Para a construção do dispositivo, eletrodos foram serigrafados em folha de poliéster utilizando tintas à base de carbono e Ag/AgCl. As estratégias para detecção dos biomarcadores foram baseadas nos imunoenaios do tipo sanduíche ou competitivo indireto. A enzima peroxidase de raiz forte (HRP) foi utilizada como marcador eletroquímico e responsável pela resposta indireta do imunossensor. A curva analítica para a ADAM10 foi linear na faixa de 5,6 a 1,4 pg mL⁻¹, com coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,983 e limite de detecção (LD) de 5,6 fg mL⁻¹. Para o biomarcador β A42, a faixa foi linear entre 1,8 a 499,2 pg mL⁻¹ do peptídeo, com $r^2 = 0,977$ e LD de 1,8 pg mL⁻¹. Amostras de plasma dos pacientes com DA e TNCL apresentaram níveis de ADAM10 significativamente aumentados quando comparado

com sujeitos saudáveis. As concentrações de β A42 encontradas no liquor foram estatisticamente diferentes entre os grupos controle e doentes. A ADAM10 e sua detecção utilizando o dispositivo aqui proposto mostraram-se como uma poderosa ferramenta para o diagnóstico precoce e monitoramento da DA o que pode trazer grandes benefícios para a qualidade de vida dos pacientes.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DISPOSABLE MICROFLUIDIC IMMUNOSENSORS FOR BIOMARKER DETECTION AIMING EARLY DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative condition that affects a large number of elderly and has an important social and economic impact. In early stages, the AD diagnosis can significantly improve patients' quality of life. Currently, AD biomarkers require diagnostic imaging procedures that are expensive or invasive. Thus, methods less invasive that allow an early, fast, and low-cost diagnosis are highly desirable. For this reason, a disposable microfluidic device was developed based on electrochemical immunosensors for detection of the biomarkers A Disintegrin And Metalloprotease 10 (ADAM10) and amyloid- β peptide with 42 amino acids ($A\beta_{42}$) in plasma and cerebrospinal fluid samples. Three elderly groups divided into cognitively healthy subjects, mild cognitive impairment (MCI), and AD patients at different disease stages were analyzed. For device construction, electrodes were screen printed on polyester foil using carbon and Ag/AgCl inks. Strategies for the biomarker's detection were based on sandwich or competitive immunoassays. The horseradish peroxidase (HRP) enzyme was used as an electrochemical marker and responsible for the indirect response of the immunosensor. The ADAM10 calibration curve was linear in the range of 5.6 to 1.4 pg mL^{-1} , with a linear correlation coefficient (r^2) of 0.983, and a limit of detection (LD) of 5.6 fg mL^{-1} . For βA_{42} biomarker, the concentration range was linear between 1.8 and 499.2 pg mL^{-1} of the peptide, with $r^2 = 0.977$ and LD of 1.8 pg mL^{-1} . Plasma samples from AD and MCI patients showed significantly increased of ADAM10 levels when compared with healthy subjects. $A\beta_{42}$ concentrations found in the cerebrospinal fluid were statistically different between the control and the diseased groups. ADAM10 and its detection using the device proposed here proved to be a powerful tool for the early

diagnosis and AD monitoring, which can bring great benefits to patients' quality of life.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Envelhecimento populacional e a Doença de Alzheimer	1
1.2	Diagnóstico da DA e biomarcadores	3
1.2.1	β -amiloide com 42 aminoácidos (β A42).....	6
1.2.2	A Disintegrin And Metallopeptidase 10 (ADAM10).....	7
1.3	Imunoensaios	9
1.4	Detecção de biomarcadores e imunossensores	14
1.4.1	Imunossensores eletroquímicos para detecção do peptídeo β -amiloide...	15
1.5	Micropartículas magnéticas e nanopartículas de ouro na determinação de biomarcadores.....	18
2	OBJETIVO.....	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	23
3.1	Reagentes e soluções	23
3.2	Instrumentação e material.....	24
3.3	Sistema microfluídico.....	25
3.4	Construção do dispositivo microfluídico descartável	25
3.4.1	Eletrodos	26
3.4.2	Canal e montagem do dispositivo.....	26

3.5 Síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutatona (AuNPs-GSH).....	28
3.6 Desenvolvimento dos imunossensores.....	29
3.6.1 Ensaio do tipo sanduíche para determinação do biomarcador ADAM10	29
3.6.2 Avaliação da constante de afinidade do anticorpo anti- β A42 com a β A42	36
3.6.3 Ensaio competitivo para determinação do biomarcador β A42.....	38
3.7 Participantes.....	43
3.7.1 Coorte 1	43
3.7.2 Coorte 2.....	44
3.8 Método comparativo para determinação dos biomarcadores	47
3.9 Tratamento estatístico dos dados	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Caracterização microscópica do eletrodo de trabalho modificado.....	49
4.2 Detecção dos biomarcadores utilizando a HRP com marcador enzimático ..	50
4.3 Determinação do biomarcador ADAM10	51
4.3.1 Estudo das condições experimentais.....	52
4.3.2 Desempenho analítico do dispositivo microfluídico para determinação do biomarcador ADAM10.....	55
4.3.3 Determinação da ADAM10 em amostras de plasma humano.....	57
4.4 Determinação do biomarcador β A42.....	67
4.4.1 Constante de associação do anticorpo anti- β A42.....	67

4.4.2 Avaliação dos imunoenaios para quantificação da β A42.....	70
4.4.3 Determinação da β A42 em amostras de soro e liquor.....	76
5 CONCLUSÃO	86
6 REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento populacional e a Doença de Alzheimer

O processo de envelhecimento populacional é um dos maiores êxitos da humanidade e também um dos grandes desafios, uma vez que é um fato mundial que tem implicações diretas na saúde pública¹. Segundo as Nações Unidas, a projeção média da população mundial com idade superior a 60 anos em 2015 era de 9 bilhões e a perspectiva para 2050 é que esse número dobre². No Brasil, segundo pesquisa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população idosa em 2018 era de cerca de 28 milhões. O órgão estima que até 2050 tenhamos cerca de 66 milhões de idosos, o que corresponderá a quase um terço da população brasileira neste mesmo ano³.

A longevidade é reflexo da melhoria da qualidade de vida e de avanços da medicina, sociais e econômicos, associados à diminuição dos índices de mortalidade e fecundidade⁴. No entanto, o crescimento desta parcela populacional está relacionado com o aumento da prevalência das demências, já que a idade é um dos principais fatores de risco^{5,6}. Segundo o Relatório Mundial de Alzheimer 2018 da *Alzheimer's Disease International* (ADI), 50 milhões de pessoas no mundo vivem com demência e a estimativa para 2050 é que esse número passe para 152 milhões⁷. No Brasil, a estimativa da prevalência de demência está entre 5 e 19% em idosos com 60 anos ou mais⁸.

A demência é uma síndrome clínica caracterizada pela redução das funções cognitivas, incluindo a memória, e interferência nos aspectos sociais ou ocupacionais. Na Doença de Alzheimer (DA), a demência é geralmente precedida por uma condição na qual o indivíduo apresenta deficiência cognitiva mensurável, conceituado como transtorno neurocognitivo leve (TNCL). No subtipo amnésico do

TNCL (TNCLa), o indivíduo possui maior risco de conversão para DA em comparação com indivíduos cognitivamente preservados⁹. Por esse motivo, o TNCLa tem ganhado atenção como alvo ideal para prevenção e intervenção precoce, pois refere-se à zona de transição entre o envelhecimento normal e fase sintomática pré-clínica da DA^{10,11}. O diagnóstico do TNCL seria uma forma de identificação preventiva de pessoas com maior risco de desenvolver a doença.

Dentro das demências, a DA é o caso mais comum, responsável por cerca de 60% a 80% dos casos¹². Ela pode ser definida como uma doença crônica não transmissível, neurodegenerativa e progressiva, caracterizada pela deterioração das funções cognitivas e de memória, comprometimento das atividades diárias e uma série de sintomas comportamentais e psicológicos¹³. As alterações cerebrais na DA incluem, macroscopicamente, a atrofia cortical, encolhimento do córtex e aumento dos ventrículos e, microscopicamente, depósitos anormais de estruturas denominadas placas senis e emaranhados neurofibrilares¹⁴ (FIGURA 1.1).

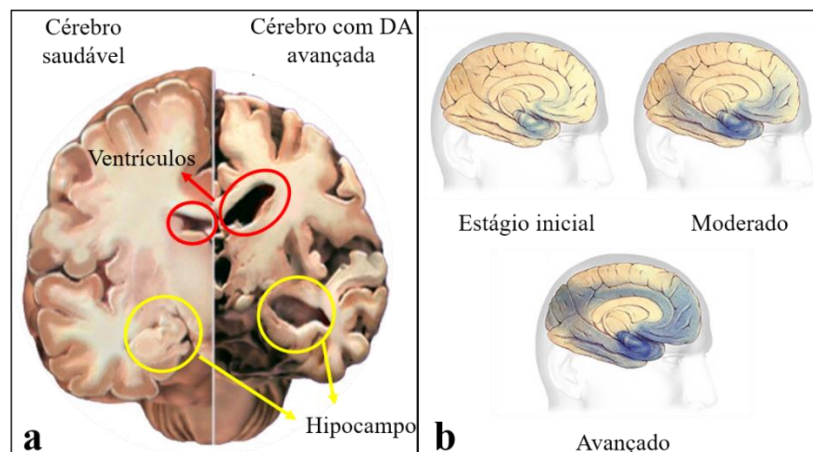


FIGURA 1.1 - a) Comparação entre um cérebro normal e com DA. Em cérebros com DA verifica-se o encolhimento do córtex e hipocampo e aumento dos ventrículos. b) As placas senis e emaranhados (mostrados nas regiões sombreadas em azul) tendem a se espalhar por todo o córtex de acordo com o avanço da doença. Fonte: Alzheimer's Association¹⁵.

As placas senis são caracterizadas por depósitos extracelulares do peptídeo β -amiloide no cérebro, ao passo que os emaranhados neurofibrilares intracelulares contêm a proteína tau fosforilada. O acúmulo desses dois fenômenos no cérebro é a principal explicação para a patogênese da DA^{16,17}.

A tau é uma proteína associada à estabilização dos microtúbulos (em condições normais) e possui grande importância na manutenção estrutural e funcional do citoesqueleto dos axônios neuronais^{18,19}. Na DA, a proteína tau sofre o processo da hiperfosforilação, que é a dissociação dos microtúbulos. Ao dissociarem, se agregam formando os emaranhados neurofibrilares compostos por filamentos helicoidais pareados^{19,20}.

As placas senis surgem a partir da formação de fibrilas amiloides e posterior acúmulo do peptídeo β -amiloide (β A) no cérebro. A hipótese da cascata β A tem sido o conceito dominante na pesquisa da DA e propõe que as placas senis consistem da acumulação e deposição de peptídeos β A insolúveis, gerados a partir de clivagens proteolíticas da Proteína Precursora do Amiloide (APP, do inglês *Amyloid Precursor Protein*)²¹. Essa agregação seria a principal causa de danos em regiões cerebrais e sintomas da DA²². Apesar hipótese da cascata β A ser sustentada na pesquisa há vários anos, outras propostas estão sendo consideradas na patogênese da DA²³, o que a torna uma doença muito mais complexa.

1.2 Diagnóstico da DA e biomarcadores

Apesar dos avanços obtidos nos estudos sobre a DA, ainda há muito a ser descoberto sobre a sua prevenção, tratamento e interrupção²⁴. O diagnóstico preciso da DA é de difícil realização, sendo que atualmente o diagnóstico definitivo é feito apenas após a morte, quando a autópsia revela placas senis e emaranhados neurofibrilares no tecido cerebral²⁵. No entanto, alterações no cérebro de pacientes

com DA têm sido relatadas em torno de 15 anos antes do início dos sintomas cognitivos²⁶. Neste período, se a doença pudesse ser diagnosticada, diferentes intervenções e opções terapêuticas poderiam ser oferecidas ao paciente para melhorar o manejo da doença ou mesmo retardar sua progressão²⁷.

No Brasil, o Ministério da Saúde atualizou, recentemente, as recomendações relativas ao diagnóstico da DA através do “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Alzheimer”²⁸ onde a Academia Brasileira de Neurologia segue os critérios do *National Institute on Aging and Alzheimer's Association Disease and Related Disorders Association (NIA/AA)*²⁹. Os parâmetros para o diagnóstico clínico são baseados na identificação das modificações cognitivas e/ou comportamentais, em testes cognitivos e exames laboratoriais²⁸.

O diagnóstico diferencial entre DA e outras demências – quando ocorre com frequência a superposição de sintomas – ainda representa um desafio clínico, sendo que outras demências menos comuns são frequentemente diagnosticadas e tratadas como DA, o que pode levar a um agravamento do quadro clínico do paciente³⁰. O diagnóstico diferencial inclui exames de imagem cerebral e determinação de marcadores biológicos em fluídos²⁸. Exames de imagem incluem técnicas como tomografia de emissão de pósitrons (PET)³¹, tomografia computadorizada por emissão de fótons (SPECT)³² e ressonância magnética (MRI)³³. No entanto, essas técnicas, além de caras e de exigirem centros especializados e profissionais treinados, se baseiam na medida dos danos neurológicos já existentes, sendo ineficientes para detectar sintomas iniciais da doença³¹. Desta forma, a eficiência do diagnóstico seria muito maior se seu uso estivesse associado aos níveis de biomarcadores, acarretando em um diagnóstico mais preciso e sensível, com melhor orientação na tomada de decisões^{13,34}.

Um biomarcador pode ser definido como um parâmetro biológico mensurável que indica a ocorrência de uma função normal, patológica ou de

respostas a um agente farmacológico³⁵. Já a Organização Mundial da Saúde descreve um biomarcador como “toda substância, estrutura ou processo que pode ser quantificado no organismo ou nos seus meios biológicos e que influencia ou prediz a incidência de uma doença”³⁶. Deste modo, o monitoramento de biomarcadores pode ser usado no diagnóstico, na determinação do estágio da doença, na evolução, prognóstico e no monitoramento da resposta a um tratamento³⁵.

Um bom biomarcador para o diagnóstico de demência deve atender a alguns critérios, entre eles os principais são: altas sensibilidade e especificidade, reprodutibilidade, obtenção por procedimentos simples e de baixo risco para o paciente e fornecer um teste rápido e de baixo custo^{37,38}.

A busca por biomarcadores da DA tem produzido candidatos que requerem procedimentos invasivos para sua análise, como os que necessitam de coleta do líquido cefalorraquidiano (também conhecido como liquor)³⁹. O liquor é um fluido corporal translúcido que circula o cérebro e a medula espinhal através do espaço subaracnóideo, ventrículos cerebrais e o canal central da medula, proporcionando uma proteção mecânica e imunológica ao cérebro dentro do crânio^{39,40}. Ele pode ser obtido por punção lombar, que é um procedimento usado para coletar uma amostra de liquor através da introdução de uma agulha entre duas vértebras da região lombar⁴¹. Embora a punção lombar seja invasiva e potencialmente dolorosa para o paciente, o liquor é o principal fluido estudado na descoberta de biomarcadores para o prognóstico de doenças neurodegenerativa⁴⁰.

Embora a busca por biomarcadores por meio de procedimentos simples e de baixo risco ao paciente tenha avançado, há ainda um grande interesse por novos biomarcadores que possam ser detectados no sangue, e que permitam uma significativa diminuição nos custos da análise e diagnósticos precoces menos invasivos^{39,42,43}.

Na presença da DA, a permeabilidade das barreiras cerebrais aumenta e o dano à barreira hematoencefálica pode aumentar o movimento bidirecional de estruturas moleculares entre o cérebro e o sangue^{44,45}. Um adulto tem cerca de 150 mL de líquor que são renovados 3 a 4 vezes ao dia, entrando em contato com o sangue por meio da barreira hematoencefálica^{44,46}. Desta forma, o sangue representa uma fonte rica para a prospecção de biomarcadores para a DA, o que leva à redução de custo nos procedimentos de análise, além de ser uma amostra de mais fácil acesso quando comparada ao líquor, sendo sua coleta minimamente invasiva.

Abaixo são discutidos os dois biomarcadores da DA selecionados neste trabalho.

1.2.1 β -amiloide com 42 aminoácidos (β A42)

O peptídeo β A é composto de 39 a 43 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 4 kDa e sua deposição no cérebro é atribuída à evolução da DA²². Por esse motivo, vários desses peptídeos são considerados biomarcadores neuroquímicos válidos para estimar o risco ou a presença da doença⁴⁷.

Entre os peptídeos β A, β A com 40 aminoácidos (β A40) é o mais abundante. No entanto, a β A com 42 aminoácidos (β A42) apresenta uma maior tendência à formação de fibrilas amiloides do que a β A40, sendo considerada essencial para a hipótese de cascata β A da DA⁴⁷. A β A42 no líquor lista como um dos biomarcadores mais bem estabelecidos e validados internacionalmente para diagnosticar a DA⁴⁷, e a diminuição dos seus níveis é um indicativo da doença^{10,48,49}. Além disso, tem sido demonstrado que a β A apresenta boa sensibilidade e especificidade na distinção de pacientes com DA de sujeitos saudáveis^{50,51}, o que é promissor para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento da doença.

A análise do líquor apresenta uma redução da β A42 altamente significativa em pacientes com a DA em comparação com sujeitos saudáveis. Essa redução da β A42 solúvel está associada ao aumento da agregação das placas senis no cérebro^{52,53}. O ideal seria associar os níveis desse peptídeo ao diagnóstico da doença utilizando uma amostra mais acessível como, por exemplo, o sangue, já que a sua obtenção é mais rápida, fácil e pouco invasiva. Entretanto, as concentrações dos biomarcadores potenciais mais conhecidos são consideravelmente menores no sangue do que as relatadas no líquor. A concentração de β A, por exemplo, é cerca de 100 vezes menor no sangue⁵⁴. Por este motivo, um desafio crucial é desenvolver um método com sensibilidade elevada para quantificar o peptídeo em sangue, já que dois fatores dificultam sua análise: níveis de β A42 diminuídos com a progressão da doença e sua concentração no sangue significativamente menor do que aquela encontrada no líquor.

1.2.2 A Disintegrin And Metallopeptidase 10 (ADAM10)

Como descrito anteriormente, as placas senis surgem a partir da formação e acúmulo do peptídeo β A42, gerados a partir de clivagens proteolíticas da APP⁵⁵. A APP pode ser degradada por duas vias, a amiloidogênica e não amiloidogênica. Nesse último caso, a APP é clivada por α -secretases que são membros da família das ADAMs (do inglês *A Disintegrin And Metallopeptidase*), termo utilizado para descrever a presença de proteína de domínios desintegrina e metalopeptidase^{19,56}. A ADAM10 é a α -secretase primordial em neurônios primários^{57,58}, ou seja, nas células mais afetadas na DA, o que a torna um potencial biomarcador para a doença⁵⁹.

ADAM10 é uma proteína de membrana com cerca de 750 aminoácidos. A estrutura multimodular da ADAM10 (FIGURA 1.2) é caracterizada pela sequência

de uma região citoplasmática C-terminal (Cyto), um domínio transmembranar (Tm), uma região rica em cisteína (Cys), um domínio desintegrina (Dis), um domínio metaloprotease e um pró-domínio (Pro) com N-terminal. A Pro-ADAM10 tem um peso molecular de ~85 kDa e após a remoção do pró-domínio, a ADAM10 de comprimento total (FL) tem ~65 kDa. A perda do ectodomínio deixa um fragmento C-terminal de ~10 kDa (CTF) ancorado à membrana e libera um ectodomínio solúvel de ~55 kDa (sADAM10)⁶⁰.

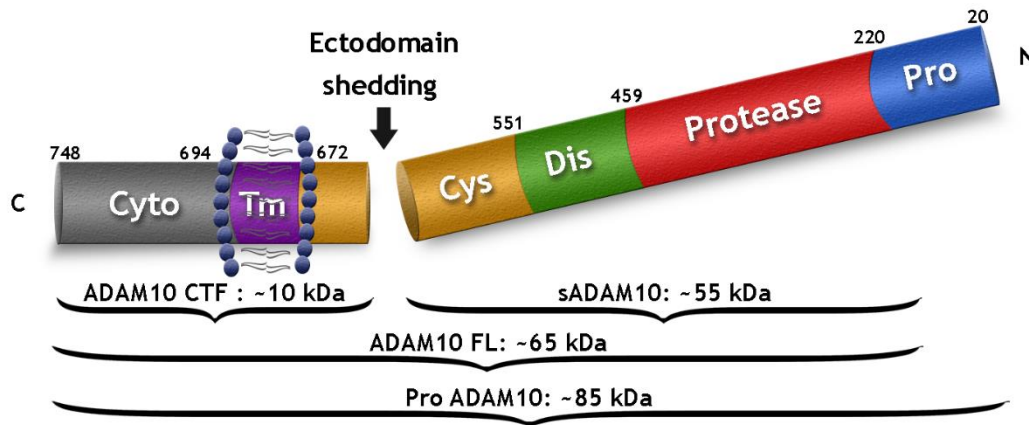


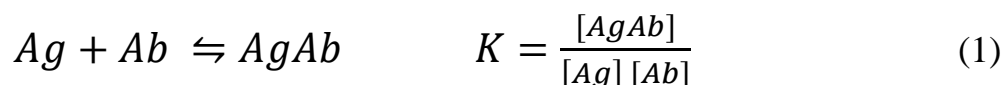
FIGURA 1.2 - Esquema da estrutura multimodular da ADAM10. Créditos: Patrícia Regina Manzine Moralles.

Nos últimos anos, o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Márcia R. Cominetti do Departamento de Gerontologia da UFSCar tem se dedicado aos estudos da ADAM10 como biomarcador para a DA. Os pesquisadores descobriram uma redução nos níveis plaquetários dessa proteína em pacientes com DA em comparação com pacientes saudáveis, sugerindo a ADAM10 como um biomarcador em potencial para a DA^{55,61-63}.

1.3 Imunoensaios

Os imunoensaios são métodos bioanalíticos de análise que se baseiam na ligação específica entre anticorpos e antígenos⁶⁴. Os imunoensaios são usados para quantificar compostos em concentrações baixas, tais como peptídeos, proteínas, hormônios, vitaminas, entre outras, e que apresentam um alto nível de especificidade contra um determinado anticorpo⁶⁵. Esse método tem sido amplamente utilizado para quantificar anticorpos ou antígenos em diversas amostras biológicas, como sangue, liquor, saliva, urina, entre outros fluídos biológicos^{64,66}.

A ligação antígeno-anticorpo ocorre por meio de múltiplas ligações não covalentes, como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e outras forças não-covalentes^{64,67}. Os anticorpos se ligam especificamente às moléculas do antígeno formando um imunocomplexo:



onde Ag representa o antígeno, Ab o anticorpo e AgAb representa o complexo antígeno-anticorpo. Essa interação é caracterizada pela constante de equilíbrio, K, definida pelas concentrações do complexo AgAb, do Ag livre e dos sítios livres dos Ab no equilíbrio, de acordo com a EQUAÇÃO 1.

Os imunoensaios podem ser classificados conforme o tipo de detecção: direto e indireto. Na detecção direta, uma superfície é revestida diretamente com o anticorpo ou o antígeno e um anticorpo ou antígeno marcado com uma enzima é utilizado para o reconhecimento e detecção. Ao se adicionar a solução da amostra, o sistema é mantido em incubação seguida por lavagem que remove os antígenos ou

anticorpos não ligados. Na FIGURA 1.3a é apresentado um modelo de detecção direta no qual um anticorpo primário marcado reage diretamente com o antígeno⁶⁶.

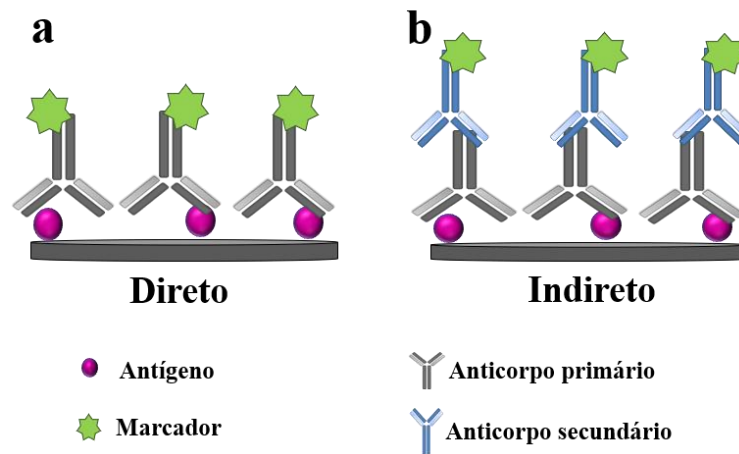


FIGURA 1.3 - Esquema do imunoenensaio do tipo a) direto e b) indireto.

Este método apresenta algumas vantagens, como ser relativamente rápido, uma vez que apenas um anticorpo é usado, e a reatividade cruzada do anticorpo secundário é eliminada. Entretanto, o ensaio apresenta algumas desvantagens, as quais incluem: a reação imunológica do anticorpo primário pode ser reduzida como resultado da marcação, mínima amplificação do sinal e nenhuma flexibilidade na escolha do marcador do anticorpo primário. Este método é adequado para determinar a quantidade de antígenos de alta massa molecular^{66,68,69}.

O método indireto usa um segundo anticorpo marcado para detecção. Inicialmente, um anticorpo primário é incubado com o antígeno e então um anticorpo secundário marcado reconhece o anticorpo primário especificamente (FIGURA 1.3b). Algumas vantagens da detecção indireta são: a grande variedade de anticorpos secundários marcados disponíveis comercialmente, a imunorreatividade máxima do anticorpo primário é mantida porque não está marcado e o aumento da sensibilidade, uma vez que cada anticorpo primário contém vários epítomos que podem se ligar ao

anticorpo secundário marcado, permitindo à amplificação do sinal. No entanto, algumas interferências, como a reatividade cruzada, podem ocorrer com o anticorpo secundário, resultando em sinal inespecífico. Além disso, é necessária uma etapa de incubação extra no procedimento, levando a um maior tempo de análise^{68,69}.

Os imunoenaios podem ainda ser divididos em dois grupos: competitivos e não competitivos. O imunoensaio do tipo competitivo é um método de “reagente limitado” e o não competitivo de “excesso de reagente”⁶⁴. Em ambos imunoenaios as estratégias de detecção podem ser direta ou indireta.

No imunoensaio não competitivo, é adicionado um excesso de imunorreativo, de modo que praticamente todo o analito irá formar um imunocomplexo. O ensaio não competitivo é geralmente chamado de tipo “sanduíche”, devido ao fato de dois anticorpos se ligarem a diferentes epítomos do antígeno, formando um sanduíche com ele no meio. Este ensaio exige o uso de um anticorpo de captura e outro de detecção, no qual cada anticorpo é específico para uma região/epítomo diferente do antígeno^{64,70,71}. A FIGURA 1.4 ilustra o formato do imunoensaio sanduíche, no qual o analito (antígeno) se liga a um anticorpo imobilizado, formando um complexo antígeno-anticorpo. Após a lavagem, um excesso do segundo anticorpo marcado é incubado e se liga ao epítomo restante na molécula do antígeno. Em seguida, o analito na amostra é quantificado mediante a correlação do sinal analítico com sua concentração no imunocomplexo^{68,69}.

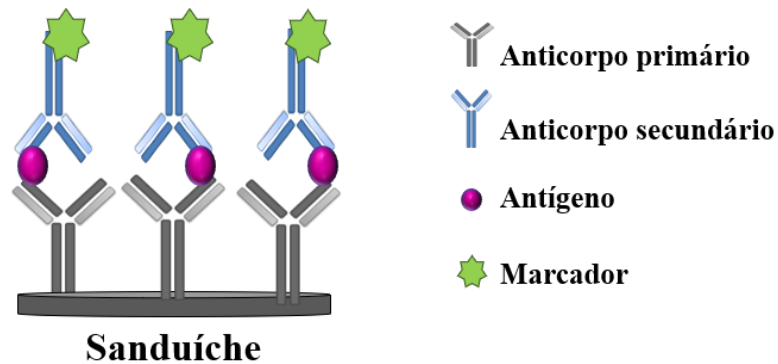


FIGURA 1.4 - Esquema do imunoenensaio do tipo sanduíche.

Comparado aos outros métodos, o imunoenensaio sanduíche é o mais sensível, preciso e robusto, por isso, o mais comumente utilizado. O baixo limite de detecção (2-5 vezes menor do que o imunoenensaio competitivo) e elevada especificidade (dois anticorpos estão envolvidos na captura e detecção) são poderosas vantagens do ensaio. Uma das limitações é que o analito precisa ser grande o suficiente de modo a ter diferentes epítomos acessíveis estericamente para ligação com os anticorpos e, assim, formar o arranjo sanduíche. Outro obstáculo é que a escolha dos anticorpos pode ser difícil, uma vez que pode ocorrer reatividade cruzada entre os anticorpos de captura e detecção^{69,72}.

Já o imunoenensaio competitivo pode ser realizado de duas formas diferentes, imobilizando o antígeno ou o anticorpo (FIGURA 1.5). Na abordagem do antígeno imobilizado, FIGURA 1.5a, o analito irá competir com o analito imobilizado por um número limitado de sítios do anticorpo marcado.

Na FIGURA 1.5b, o analito compete com um mesmo composto marcado por meio de uma quantidade limitada de locais de ligação do anticorpo específico (que está imobilizado). Nos dois formatos, após um certo período de tempo de incubação, a fração não ligada é removida por meio de lavagens e o sinal analítico, obtido por meio do marcador, é medido. O sinal obtido é relacionado à concentração do analito na amostra, sendo eles inversamente proporcionais^{64,73,74}.

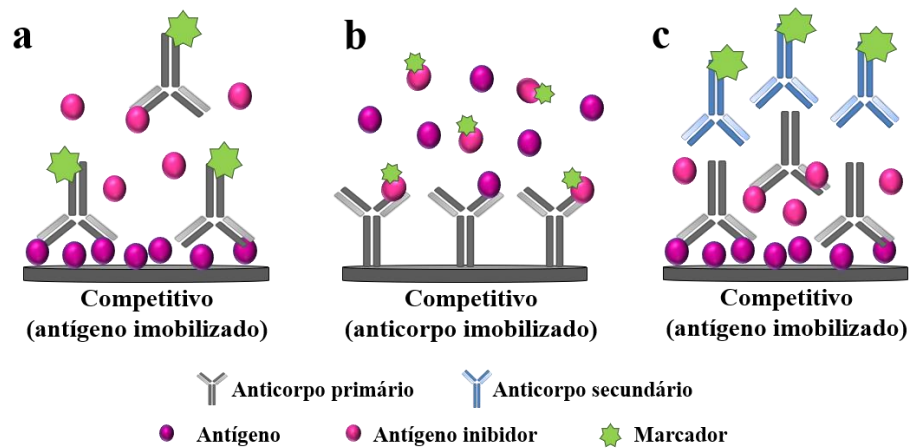


FIGURA 1.5 - Esquema do imunoenensaio competitivo direto com a) antígenos imobilizados e anticorpo marcado e b) anticorpo imobilizado e o antígeno marcado. c) Esquema do imunoenensaio competitivo indireto com antígenos imobilizados e anticorpo secundário marcado.

A FIGURA 1.5c representa o ensaio competitivo indireto, onde utiliza-se como anticorpo de detecção um segundo anticorpo marcado. As imunorreações competitivas ocorrem como no ensaio direto, no entanto, uma etapa com o anticorpo secundário marcado é acrescida.

Em geral, o ensaio competitivo não é tão sensível como um do tipo sanduíche, possui uma faixa de trabalho com concentração mais estreita e é mais suscetível ao efeito da matriz⁷². Como o imunoenensaio sanduíche envolve dois anticorpos, ele oferece uma especificidade melhor do que os ensaios competitivos e sua sensibilidade é determinada a partir da ligação específica dos imunorreativos marcados. Já a sensibilidade do ensaio competitivo é limitada pela constante de afinidade do anticorpo utilizado^{64,72,74}.

O imunoenensaio competitivo é frequentemente usado quando o antígeno é pequeno e tem apenas um epítopo (não pode ser ligado por dois anticorpos

diferentes como no método sanduíche) e também quando apenas um anticorpo está disponível para o antígeno de interesse^{68,69}.

Neste trabalho, a estratégia para a detecção do biomarcador ADAM10 foi o ensaio do tipo sanduíche, buscando as vantagens descritas acima. Porém, como o peptídeo β A42 possui baixa massa molecular (42 aminoácidos com ~4,5 kDa) não foi encontrado mais do que um anticorpo que reconhecesse diferentes epítomos do biomarcador. Desta forma, estratégias de detecção utilizando imunoenaios competitivos fizeram-se necessárias.

1.4 Detecção de biomarcadores e imunossensores

Diversos métodos têm sido aplicados para a determinação de biomarcadores em análises clínicas, como o ensaio imunoenzimático ELISA⁷⁵⁻⁷⁷ (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), sistema de imunensaio multiplexado baseado em partículas magnéticas^{78,79} (tecnologia Luminex xMap[®]) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)⁸⁰⁻⁸². Apesar de serem métodos importantes na detecção clínica de biomarcadores, essas técnicas apresentam alto custo de aquisição e operação, elevado tempo de análise e requerem grande quantidade de amostra, sendo que algumas técnicas são complexas para determinação de diferentes proteínas simultaneamente⁸³. Para superar algumas dessas limitações, sensores eletroquímicos vêm sendo desenvolvidos com a mesma e até superior sensibilidade, com quantificação de biomarcadores relativamente simples, análises rápidas e de baixo custo⁸⁴⁻⁸⁸.

Um biossensor, em geral, é composto por um biorreceptor, que é a biomolécula que reconhece o analito alvo e o transdutor, que converte o evento de reconhecimento em um sinal mensurável⁸⁹. Quando um biossensor é modificado com um antígeno ou anticorpo específico, ele é denominado imunossensor⁹⁰. A reação de

reconhecimento entre o anticorpo e o antígeno define a alta seletividade e sensibilidade do dispositivo⁹¹. A parte eletrônica é utilizada para amplificar e digitalizar o sinal de saída dos sensores, tais como transdutores eletroquímicos (amperométrico, potenciométrico, condutométrico, impedimétrico), ópticos (fluorescência, índice de refração) ou piezelétricos^{91,92}.

A microfluídica é a tecnologia de sistemas que processam ou manipulam pequenas quantidades de fluidos, usando canais que têm pelo menos uma de suas três dimensões na ordem de micrômetros^{93,94}. A construção de imunossensores é de fácil automação e miniaturização^{85,86,95}. Quando empregados em sistemas microfluídicos, os imunossensores requerem baixos volumes de amostra e possibilidade de automação, possibilitando ganhos em precisão, repetibilidade e frequência analítica, além de baixo custo quando comparado com métodos tradicionais de análise de biomarcadores^{96,97}.

1.4.1 Imunossensores eletroquímicos para detecção do peptídeo β -amiloide

Diferentes trabalhos envolvendo o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para detecção do peptídeo β A42 como biomarcador para a DA podem ser encontrados na literatura. Porém, na maioria dos trabalhos, o método desenvolvido não é aplicado em amostras biológicas reais. Alguns desses trabalhos estão descritos abaixo.

Um imunossensor reutilizável baseado em eletrodo de ouro modificado com grafeno dopado com nanopartículas superparamagnéticas e conjugados com anticorpos anti- β A42 foi desenvolvido por Li et al.⁹⁸. O biossensor apresentou linearidade no intervalo de 5 a 800 pg mL⁻¹, com limite de detecção de 5 pg mL⁻¹. Mesmo demonstrando a alta sensibilidade analítica do sensor para potencial

aplicação no diagnóstico da DA, os autores não testaram o dispositivo em nenhuma amostra real e nem mesmo numa matriz mais complexa.

Rama e colaboradores desenvolveram um imunossensor eletroquímico descartável para detecção da β A42⁹⁹. Eletrodos serigrafados nanoestruturados com nanopartículas de ouro foram modificados com biotina- β A42. A estratégia de detecção do peptídeo consistiu no imunoensaio competitivo indireto, sendo que o analito imobilizado e livre competiram pelo anticorpo anti- β A42. A detecção se deu pelo anticorpo IgG marcado com a enzima fosfatase alcalina. O sensor apresentou um limite de quantificação de 400 pg mL^{-1} , com faixa linear de 500 pg mL^{-1} a 500 ng mL^{-1} . Os autores sugerem o uso do imunossensor no diagnóstico da DA, mas, considerando que o valor de corte da β A42 no liquor é de 500 pg mL^{-1} , e que no liquor de pacientes com DA os níveis destes biomarcador tendem a serem inferiores a esse, o imunossensor apresentado não possui sensibilidade analítica suficiente para a detecção do peptídeo.

Um método baseado no imunoensaio competitivo para a detecção simultânea do peptídeo β A42 e β A total foi desenvolvido por Liu et al.¹⁰⁰. Um imunossensor modificado com anticorpos anti- β A foi exposto aos peptídeos β A nativo e β A biotinizados e um bioconjugado de estreptavidina com a enzima fosfatase alcalina foi utilizado como marcador eletroquímico. Um limite de detecção de 10 pg mL^{-1} foi obtido e o método foi aplicado em amostras de liquor artificial contendo β A40, β A42 e β A16.

Yu e colaboradores desenvolveram um sensor empregando um bioconjugado gelsolina-Au-HRP para determinar os peptídeos solúveis β A40/42. O reconhecimento do peptídeo β A se deu pela proteína gelsolina que, segundo os autores, se liga especificamente aos peptídeos β A40/42. O método foi empregado na detecção da β A40/42 em amostras de liquor e tecido cerebrais (hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado) de ratos normais e com DA. Os resultados indicaram

que, em comparação com o grupo normal, os níveis solúveis do peptídeo diminuíram em níveis diferenciáveis¹⁰¹.

Carneiro et al. desenvolveram um imunossensor do tipo *label-free* modificado com monocamadas automontadas de ácido mercaptopropiônico, nanopartículas de ouro e anticorpo monoclonal¹⁰². A β A42 foi detectada dentro da faixa linear de 10 a 1000 pg mL⁻¹ com limites de detecção e quantificação de 5,2 pg mL⁻¹ e 17,4 pg mL⁻¹, respectivamente. A exatidão do método foi avaliada por meio de teste de adição e recuperação que variou entre 90,3% e 93,6%. O sensor não foi aplicado na análise de amostra biológica nem em uma matriz mais complexa.

Quanto à detecção da β A em amostra de plasma, apenas dois trabalhos com imunossensores eletroquímicos foram encontrados^{103,104}.

Um biossensor baseado no uso de partículas magnéticas modificadas com anticorpos para captura do biomarcador β A à partir de amostras biológicas foi descrito por De La Escosura-Muñiz e colaboradores¹⁰³. O imunoenensaio do tipo sanduíche envolveu a captura do analito por meio das partículas modificadas com o anticorpo, seguido da incubação com o anticorpo de detecção marcado com ouro. O sinal monitorado é do efeito eletrocatalítico para a reação de evolução de hidrogênio, que foi proporcional a concentração do biomarcador. O imunossensor foi aplicado na quantificação de β A em amostras de liquor, soro e plasma de pacientes. No entanto, foi possível determinar níveis do peptídeo apenas no liquor, sugerindo que as concentrações β A em soro e plasma são inferiores ao limite de detecção do método (19 pg mL⁻¹).

Diba e colaboradores desenvolveram um imunossensor eletroquímico do tipo sanduíche para a detecção do peptídeo β A42 em amostras de soro e plasma¹⁰⁴. A enzima fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo de detecção permitiu a medida do substrato fosfato 4-aminofenol que foi proporcional à concentração da β A42. A técnica de voltametria de pulso diferencial foi utilizada e alcançaram respostas

lineares na faixa de 450 pg mL^{-1} a 112 ng mL^{-1} . Amostras de soro e plasma foram diluídas e analisadas diretamente. Apesar do sucesso na aplicação do imunossensor em amostras comerciais, os pesquisadores não compararam com amostras de pacientes com DA.

Alguns trabalhos utilizando imunossensores impedimétricos para a detecção da βA42 também foram descritos¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. No entanto, nenhum dos trabalhos utilizaram amostras biológicas reais em seus estudos. Em relação a ADAM10, nenhum sensor para a sua detecção foi encontrado na literatura.

1.5 Micropartículas magnéticas e nanopartículas de ouro na determinação de biomarcadores

A nanotecnologia orientada ao desenvolvimento de imunossensores representa uma alternativa interessante como estratégia de detecção eficiente, rápida e com baixos limites de detecção. O uso de partículas magnéticas (PMs) para captura, separação e pré-concentração do analito em imunoenaios tem sido amplamente descrito^{84,108}.

O uso de PMs pode melhorar significativamente o desempenho do imunossensor devido ao aumento da capacidade de ligação resultante da sua elevada área superficial¹⁰⁹. As PMs consistem em um núcleo paramagnético ou superparamagnético, geralmente formado a partir de uma dispersão de Fe_2O_3 e Fe_3O_4 , os quais se destacam pela biocompatibilidade comprovada em biomarcação e bioseparação¹¹⁰. As PMs podem ainda ser facilmente funcionalizadas com diferentes grupos, como carboxila e aminas, que permitem ligação covalente com anticorpos ou proteínas, podendo também, ser obtidas comercialmente já funcionalizadas com o grupo/biomolécula desejado^{84,88,111}.

Partículas magnéticas têm sido empregadas em protocolos de ensaio imunomagnético. Ao capturar o analito em uma amostra, as PMs bioconjugadas podem ser separadas por meio de uma estante magnética. Durante as etapas de lavagem, há eliminação dos interferentes, minimizando ligações não específicas com outras possíveis biomoléculas^{87,112,113}. Além disso, as PMs conjugadas podem ser ressuspendidas em um volume menor, pré-concentrando o analito contido em amostras diluídas e complexas⁸⁴, como, por exemplo, o sangue.

A FIGURA 1.6 apresenta duas estratégias para a detecção eletroquímica de biomarcadores utilizando imunossensores do tipo sanduíche, a estratégia convencional e a estratégia com as PMs decoradas com dezenas de milhares de enzimas e anticorpos. A FIGURA 1.6a mostra a estratégia convencional, no qual os anticorpos de captura que estão na superfície do sensor capturam a proteína-alvo. Em seguida, liga-se um anticorpo de detecção marcado com uma enzima⁸⁷. Nesta estratégia, há um evento de ligação para cada analito, ou seja, uma enzima para uma proteína-alvo. Na FIGURA 1.6b, as PMs são revestidas com enzimas e anticorpos. Nessa estratégia, para uma partícula de 1 μm , cerca de 200.000 ~ 400.000 enzimas *horseradish peroxidase* (HRP) e aproximadamente 90.000 ~ 120.000 anticorpos são conjugados^{87,88,112}. Essa abordagem é bastante vantajosa, pois capturam o analito na amostra em concentrações muito baixas, diminuindo consideravelmente a detectabilidade do dispositivo. Além do benefício adicional, uma vez que PMs fortemente marcadas fornecem grande amplificação do sinal analítico, melhorando a sensibilidade dos imunossensores^{87,114}.

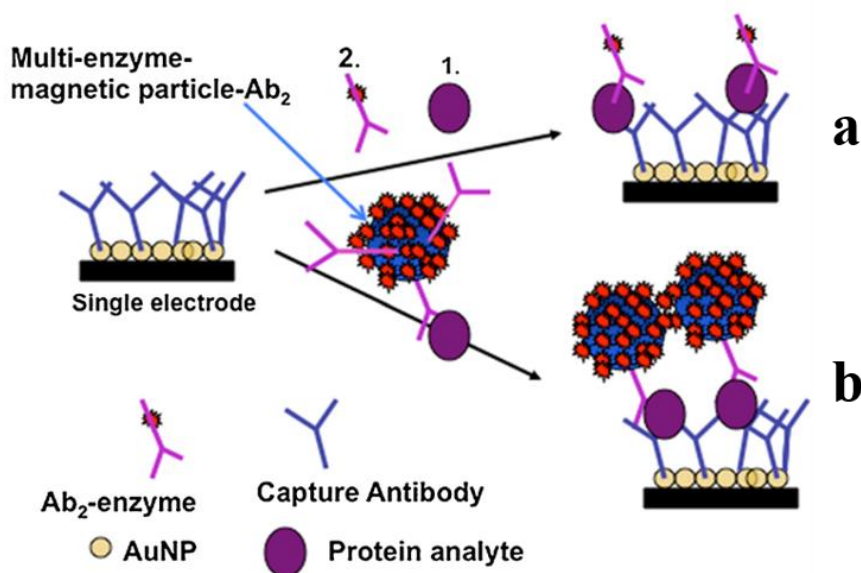


FIGURA 1.6 - a) Esquema de detecção do analito utilizando um imunossensor convencional. b) Estratégia de detecção utilizando PMs conjugadas com dezenas de milhares de enzimas e anticorpos para amplificação do sinal analítico. Fonte: CHIKKAVEERIAIAH et al., 2011⁸⁷.

Nanopartículas de ouro (AuNPs) também são nanomateriais utilizados na modificação do eletrodo para a ancoragem de anticorpos, bem como podem ser aplicadas como marcadores eletroquímicos^{95,103}. As AuNPs possuem boa biocompatibilidade, elevada estabilidade e grande área de superfície ativa, além de possuir boa condutividade, o que facilita a velocidade de transferência eletrônica¹¹⁵.

Para tornar as AuNPs biocompatíveis, em geral, elas são modificadas com intermediários de imobilização, que possuem grupos funcionais que permitam a imobilização do anticorpo/antígeno por meio de ligações covalentes ou interações eletrostáticas^{116,117}. Mani e colaboradores¹¹⁸ propuseram o desenvolvimento de um imunossensor modificando-o com uma camada de AuNP densamente decorada com glutathione sobre uma camada subjacente de poli(cloreto de dialildimetilamônio), um polímero catiônico, depositado em um eletrodo de trabalho de grafite pirolítico¹¹⁸.

Além das AuNPs propiciarem um aumento significativo da área eletroativa do eletrodo, permitiram a bioconjugação de grandes quantidades de anticorpos no meio dos grupos glutationa, um fator importante para a melhora da sensibilidade do imunossensor.

A combinação das propriedades das PMs e AuNPs no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos constituem numa plataforma atrativa para o aumento da sensibilidade analítica e robustez do dispositivo¹¹⁸⁻¹²¹.

Ainda, como supracitado, operações e ensaios analíticos podem ser facilitados usando sistemas microfluídicos. Dispositivos microfluídicos requerem pequenos volumes de amostras, dispõe de tempos relativamente curtos de análise com baixo custo, oferece boa reprodutibilidade, além de não exigir pessoal qualificado para o manuseio do sistema^{122,123}.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Desenvolver dispositivos microfluídicos descartáveis para o diagnóstico da doença de Alzheimer por meio da detecção dos biomarcadores β A42 e ADAM10.

2.2 Objetivos específicos

Desenvolver e caracterizar eletrodos descartáveis por meio de prototipagem rápida;

Estudar as condições experimentais na detecção dos biomarcadores;

Calcular a constante de afinidade aparente entre o anticorpo anti- β A42 e o peptídeo β A42, uma vez que o ensaio competitivo utilizado para detecção deste biomarcador é limitado pela constante de afinidade do anticorpo.

Aplicar os imunoenaios na quantificação dos biomarcadores em amostras de sangue e liquor de pacientes com DA, TNCL e de indivíduos saudáveis (controle) e avaliar a correlação entre os resultados obtidos com o diagnóstico precoce da DA;

Comparar os resultados obtidos para detecção dos biomarcadores com um método estabelecido;

Avaliar estatisticamente a sensibilidade e especificidade dos imunoenaios.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Ácido ferroceno monocarboxílico, ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES), albumina de soro bovino (BSA), ácido cloroáurico 99,9% ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), borohidreto de sódio, citrato trisódico, enzima horseradish peroxidase (HRP), glicina, HEPES ((N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)), hidroquinona (HQ, $\geq 99\%$), enzima *horseradish peroxidase* (HRP), L-glutathiona reduzida (GSH), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30%), solução de poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA), soro de bezerro e Tween 20 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), metanol e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Esferas magnéticas de 1 μm funcionalizadas com grupo carboxílico (PMs) foram obtidas da Polysciences, Inc. (Prod. n° 86011, Warrington, USA) e Invitrogen (Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid, Prod. n° 65012, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Anticorpo monoclonal Anti-ADAM10 [11G2] (Produto ab59482), anticorpo policlonal anti-ADAM10 (Produto ab39180), proteína recombinante ADAM10 humana (Produto PRO-476, Prospec), Anti-Mouse IgG1 com HRP adsorvida (IgG-HRP) (Produto ab98693) foram obtidos da Abcam (Cambridge, MA, USA). Peptídeo βA42 (AS-24224) e anticorpo monoclonal Anti- βA42 (Produto AS-55922) foram obtidos da Anaspec (Fremont, CA, USA). Anti-IgG de camundongo (Produto M8642) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções eram de pureza analítica. Tampão fosfato salino (PBS) 10 mmol L⁻¹ consistido de Na₂HPO₄ 10 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 1,8 mmol L⁻¹, KCl 2,7 mmol L⁻¹ e NaCl 137 mmol L⁻¹, sendo que o pH foi ajustado para o valor desejado. Tampão PBS com Tween 20 0,05% (m/v) (PBS-TW). Anticorpos, antígenos e BSA foram dissolvidos/diluídos em PBS. EDC e NHS foram preparados em água imediatamente antes do uso.

3.2 Instrumentação e material

Vinil Adesivo e folha de poliéster (transparência) foram adquiridos no comércio local em São Carlos/SP.

Para a fabricação dos eletrodos descartáveis, utilizou-se uma impressora de recorte Silhouette Cameo (Silhouette, Brasil) e uma *plotter* de recorte (F1 Suprimentos, Brasil). Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando um multipotenciostato portátil μ STAT8000 da Dropsens (Metrohm, Espanha) conectado a um computador utilizando o software DropView 8400. Uma bomba de seringa (New Era Pumping System NE-1000, USA) e uma válvula injetora (Rheodyne 9725i, Thermo Scientific, USA) foram utilizadas no sistema microfluídico.

Para as medidas de pH, utilizou-se um pHmetro Digimed DM20 (Digimed, Brasil). As soluções foram preparadas com água purificada obtida em um sistema de purificação Milli-Q da Millipore (Millipore, Bedford, USA). Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas dos equipamentos FEI Inspect F50 e FEI Tecnai G2 F20 X-twin 200KV, respectivamente.

3.3 Sistema microfluídico

O sistema microfluídico utilizado para fazer as medidas dos biomarcadores (FIGURA 3.2) consistiu de uma bomba de seringa, injetor manual e o dispositivo microfluídico descartável. A bomba de seringa foi utilizada para o carregamento das soluções aquosas para o canal microfluídico, sendo está conectada a válvula injetora manual e ao dispositivo microfluídico por meio de tubos PEEK. Um computador pessoal foi utilizado para controle do potenciostato e registro da resposta eletroquímica.

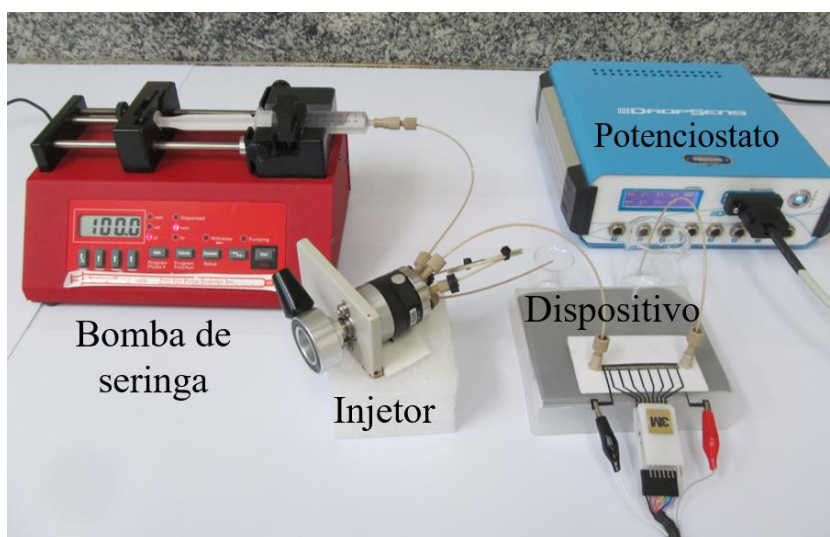


FIGURA 3.1 - Sistema microfluídico acoplado ao multipotenciostato.

3.4 Construção do dispositivo microfluídico descartável

O dispositivo microfluídico, que consiste no arranjo de oito eletrodos de trabalho, eletrodo de pseudo-referência e eletrodo auxiliar, foi construído utilizando material de baixo custo e uma impressora de recorte. A fabricação dos eletrodos de

carbono serigrafados (do inglês *screen-printed carbono electrode*, SPCE) foi previamente descrita pelo nosso grupo¹²⁴.

3.4.1 Eletrodos

O molde dos eletrodos foi desenhado pelo software Silhouette Studio™ v3.8 e recortado usando a impressora artesanal de recorte. Utilizando uma folha de adesivo vinílico, o layout foi recortado e as partes adesivas não desejadas foram retiradas por meio de uma pinça (FIGURA 3.2a). O vinil foi colado sobre uma folha de poliéster e sobre ela foi aplicada a tinta de carbono (C2160602D2, Gwent Electronic Materials Ltd, UK), com auxílio de um pequeno rodo (FIGURA 3.2b). Dessa maneira, a tinta de carbono pode se espalhar entre o molde do vinil e recobrir o substrato de poliéster. Em seguida os eletrodos foram submetidos a um tratamento térmico por 30 minutos à 90 °C. Após a secagem da tinta de carbono, retirou-se o adesivo vinílico (FIGURA 3.2c) e obteve-se os SPCEs na folha de poliéster (FIGURA 3.2d). O mesmo procedimento foi repetido para os eletrodos de pseudo-referência de Ag/AgCl (FIGURA 3.2a'-d'), acrescido da etapa de deposição da tinta de Ag/AgCl (C2051014P10, Gwent Electronic Materials Ltd, UK) (FIGURA 3.2c'). A tinta foi aplicada sobre o SPCE e levada à cura por 30 minutos à 60 °C sendo, em seguida, o adesivo removido.

3.4.2 Canal e montagem do dispositivo

Uma plotter de recorte foi utilizada para cortar o cartão adesivo dupla face de poliestireno. O adesivo dupla face foi utilizado como isolante na montagem da célula microfluídica, em que o canal do mesmo foi adequadamente cortado e montado de modo a permanecer apenas a área exposta dos eletrodos de trabalho,

auxiliar e de pseudo-referência, bem como os contatos elétricos. A partir do corte do cartão, em um dos seus lados foi colado o conjunto de oito eletrodos de trabalho (2,0 mm de diâmetro cada) e eletrodo auxiliar (28 mm x 1,8 mm). No outro lado foi colocado a folha de transparência contendo o eletrodo de pseudo-referência (30 mm x 1,25 mm) de Ag/AgCl (FIGURA 3.1e).

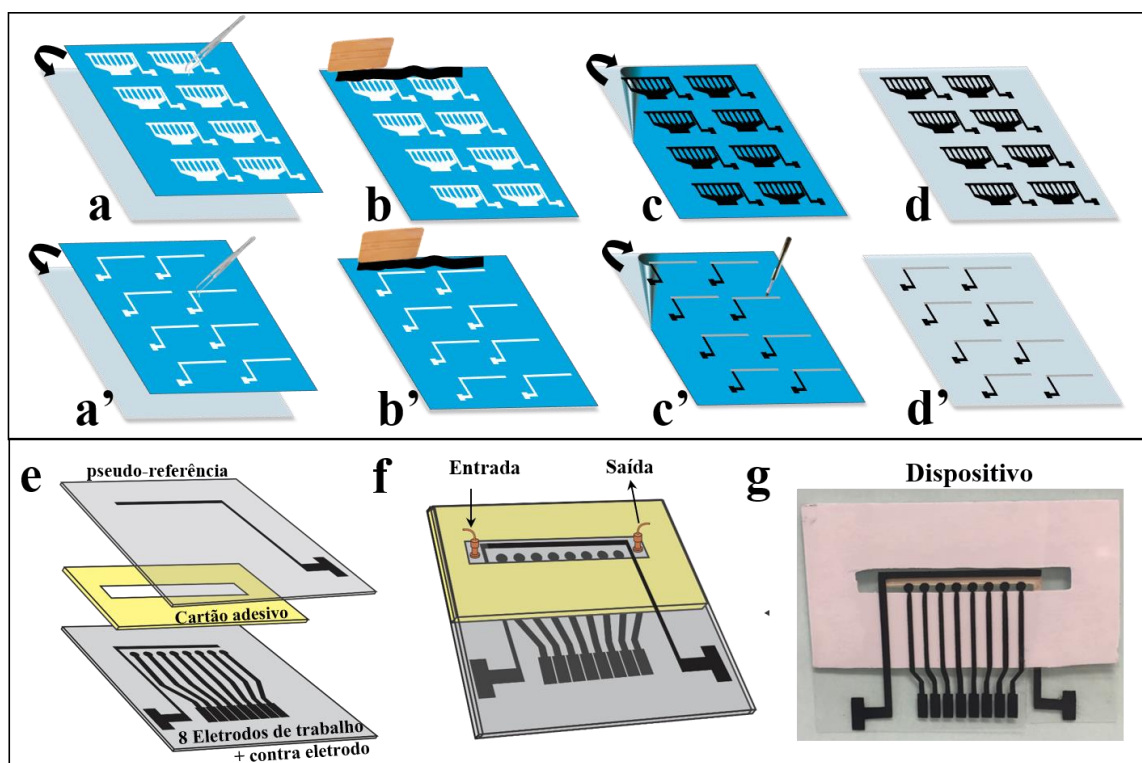


FIGURA 3.2 - Representação esquemática da fabricação dos eletrodos de trabalho, auxiliar e pseudo-referência: a e a') O vinil adesivo com o corte dos eletrodos são removidos com o auxílio de uma pinça; b e b') transferência do vinil para a folha de poliéster e aplicação de tinta de carbono; c) Remoção do adesivo vinílico e c') deposição da tinta de Ag/AgCl para produzir o eletrodo de pseudo-referência antes da remoção de vinil; d e d') Eletrodos de carbono e pseudo-referência impressos; e) Esquema representativo da construção do dispositivo microfluídico; f) Dispositivo microfluídico descartável com os conectores de entrada e saída da solução; g) foto do dispositivo.

Na FIGURA 3.1f tem-se o esquema do dispositivo microfluídico descartável montado. As dimensões do canal foram de 35 mm de comprimento por 4 mm de largura e 0,3 mm de espessura, com um volume interno de 42 μL . Foram feitos dois furos nas extremidades do canal microfluídico para entrada e saída das soluções. Os furos foram fixados com dois conectores a base de poliéter-éter-cetona (PEEK) de 0,2 mm, e presos com uma fita adesiva 3M Command™. A FIGURA 3.1g apresenta uma foto do dispositivo microfluídico descartável finalizado.

3.5 Síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona (AuNPs-GSH)

As AuNPs-GSH foram utilizadas para modificar os eletrodos de trabalho e ancorar as biomoléculas na superfície do mesmo. As AuNPs-GSH com um diâmetro de aproximadamente 5 nm foram preparadas pela redução do sal de ouro usando borohidreto de sódio na presença de glutathiona¹¹⁸, como ilustrado na FIGURA 3.3.

Para isto, pesou-se 79 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 308 mg de glutathiona que foram dissolvidos em 2 mL de ácido acético e 12 mL de metanol, resultando em uma solução de cor amarelo claro. Preparou-se uma solução de 20 mg mL^{-1} de borohidreto de sódio e, mantendo-a em banho de gelo, adicionou-se gota-a-gota à solução anterior sob rápida agitação, deixando-a agitando por 2h.

A solução foi filtrada utilizando uma membrana de filtração molecular de 50 kDa e centrifugada a 3500 rpm. O precipitado foi lavado quatro vezes com água e ressuspenso em 15 mL de tampão HEPES 20 mmol L^{-1} (pH 8,0). A dispersão foi estocada à 4 °C.

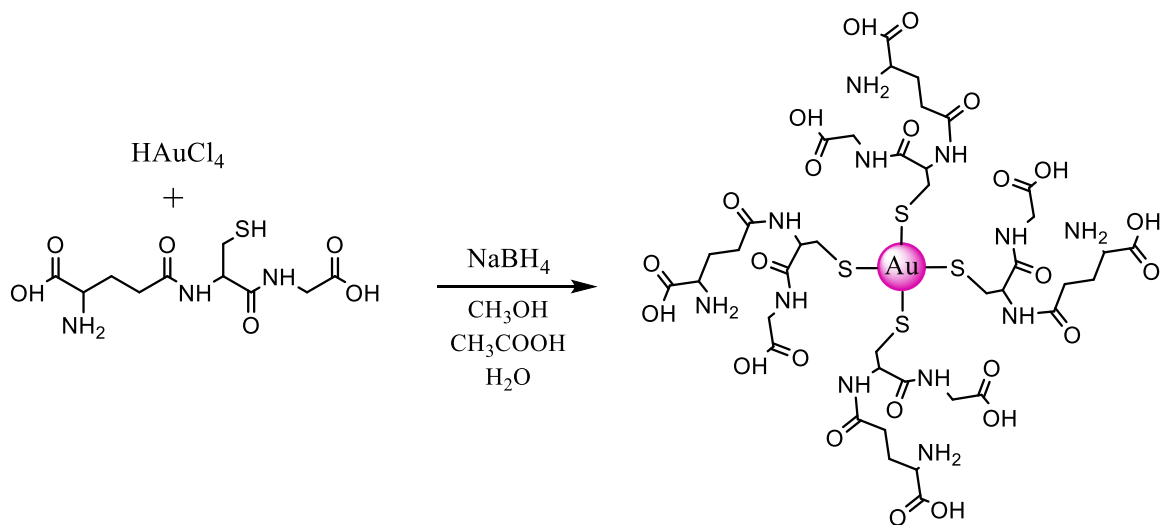


FIGURA 3.3 – Esquema da síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona.

3.6 Desenvolvimento dos imunossensores

Neste trabalho, duas estratégias foram utilizadas no desenvolvimento dos imunossensores para detecção dos biomarcadores da DA. A primeira foi o ensaio do tipo sanduíche na detecção da proteína ADAM10 e a segunda estratégia foi utilizar o método competitivo indireto para a determinação do peptídeo β A42.

3.6.1 Ensaio do tipo sanduíche para determinação do biomarcador ADAM10

A construção do sensor baseado no imunensaio do tipo sanduíche foi dividido em três etapas, conforme representado na FIGURA 3.4. Inicialmente foi realizada a modificação dos eletrodos de trabalho ancorando o anticorpo monoclonal anti-ADAM10 (Ab₁) na sua superfície. A segunda etapa consistiu em modificar as PMs com o anticorpo policlonal anti-ADAM10 (Ab₂) e a enzima HRP (Ab₂-PM-

HRP). Com as etapas finalizadas, foi realizada a captura do biomarcador na amostra por meio das Ab_2 -PM-HRP e incubado no canal microfluídico para contato e reconhecimento pelo Ab_1 . As etapas detalhadas estão descritas nas próximas seções.

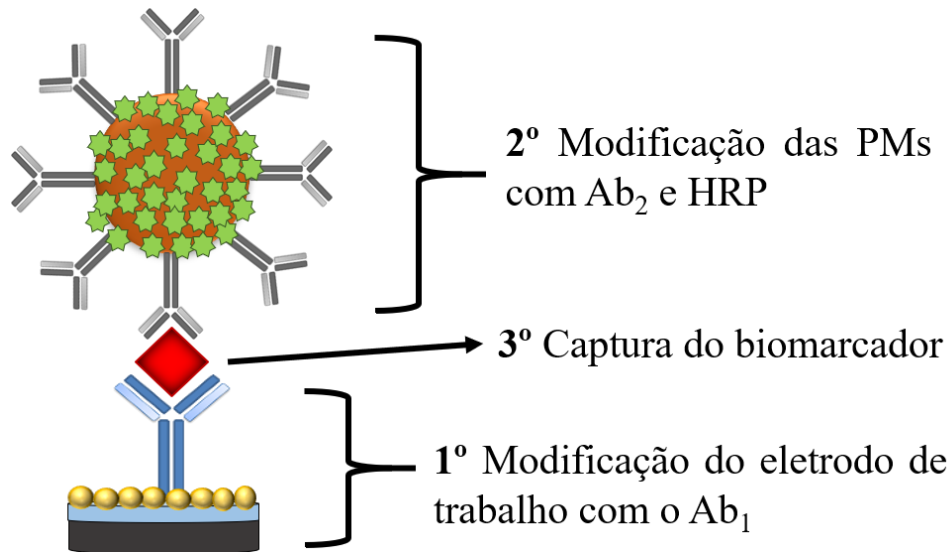


FIGURA 3.4 - Esquema das etapas de construção do imunossensor baseado no ensaio do tipo sanduíche.

3.6.1.1 Modificação do eletrodo de trabalho como o anticorpo monoclonal

Os eletrodos de trabalho foram modificados antes de selá-los contra o cartão dupla face. A modificação foi realizada pela técnica de *Layer-by-layer (LbL)*, que consiste na adsorção eletrostática de camadas do polycation PDDA e AuNPs-GSH sobre o eletrodo de carbono seguida da imobilização covalente do Ab_1 sobre as AuNPs-GSH^{84,125}. O esquema simplificado da modificação está representado na FIGURA 3.5.

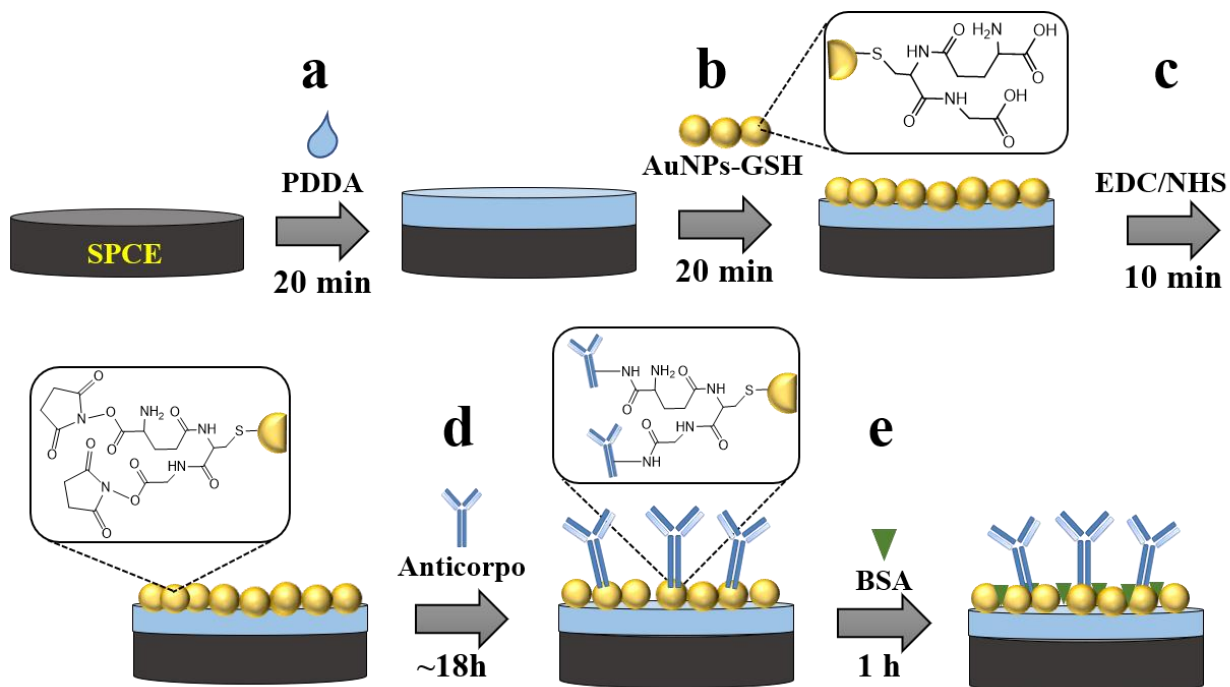


FIGURA 3.5 - Esquema da modificação dos eletrodos de trabalho por meio de filme *LbL* de PDDA e AuNPs-GSH e imobilização do covalente do Ab₁. a) Adição da solução de PDDA sobre a superfície do SPCE; b) Adição das AuNPs-GSH; c) Uma solução mista de EDC/NHS foi adicionada para ativação dos grupos carboxilas da GSH; d) Em seguida, uma solução do Ab₁ foi adicionada e deixada por aproximadamente 18h; d) Finalização do preparo do eletrodo com a adição de BSA para bloqueio dos sítios de ligação livres.

Os SPCEs foram lavados com água e, após a secagem, colocados em uma placa de Petri contendo papel umedecido a fim de manter a umidade elevada. Sobre os eletrodos de trabalho foram adicionados 5 μL de uma solução contendo PDDA 2 mg mL^{-1} preparado em NaCl 50 mmol L^{-1} e deixados por 20 minutos. Após esse tempo, os eletrodos modificados foram lavados cuidadosamente com água. Após, 5 μL da dispersão AuNPs-GHS foram adicionados sobre cada eletrodo de trabalho e deixados por mais 20 minutos, sendo em seguida lavados.

Uma vez modificada a superfície dos eletrodos com o *LbL*, para a imobilização do Ab_1 , foram adicionados 5 μL de uma solução recém preparada de EDC 0,4 mol L^{-1} e NHS 0,1 mol L^{-1} em água. Essa solução foi deixada por 10 minutos para a ativação dos grupos carboxílicos da GSH. Após esse tempo, o eletrodo foi mergulhado três vezes em um béquer contendo água para a lavagem e seco, cuidadosamente, com papel absorvente. Em seguida, 5 μL da solução de Ab_1 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, preparada em tampão PBS pH 7,4, foram adicionados e deixado por 18 horas à 4 °C para a completa imobilização do anticorpo sobre o eletrodo.

Por fim, os eletrodos foram lavados com tampão PBS-TW e então uma solução de BSA 0,5% foi aplicada por 1 hora a fim de bloquear sítios de ligação disponíveis e, conseqüentemente, reações não específicas. Após o bloqueio, os eletrodos foram lavados com tampão PBS-TW pH 7,4 e armazenado sob refrigeração.

3.6.1.2 Modificação das PMs com Ab_1 e HRP

A modificação das PMs foi realizada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante (Polysciences, Inc) com algumas adaptações. A FIGURA 3.6 apresenta as etapas relativas à modificação das PMs com Ab_2 e HRP. Para isso, 98 μL de PMs comerciais (1,0 μm de diâmetro) foram dispersas em 1 mL de tampão MES 50 mmol L^{-1} pH 5,2. A dispersão foi separada magneticamente, por meio de um suporte magnético Eppendorfs® com imãs atuando na lateral dos mesmos, e então adicionou-se uma solução de EDC 3,2 mg mL^{-1} recém preparada para ativar o grupamento carboxila, deixando em agitação suave por 30 min à temperatura ambiente. A mistura resultante foi novamente separada magneticamente e o sobrenadante foi descartado e lavado com tampão MES 50 mmol L^{-1} .

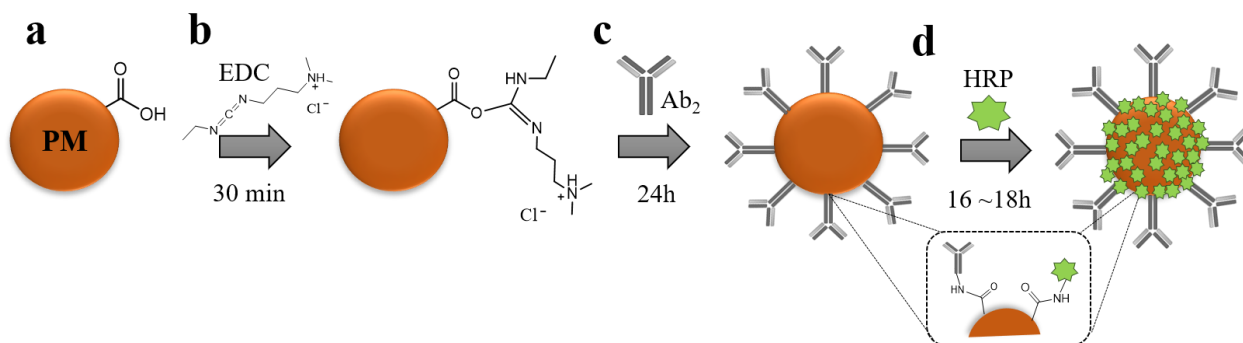


FIGURA 3.6 - Diagrama esquemático da modificação das PMs. a) PM comercial contendo grupo carboxila; b) PM foi ativada com EDC por 30 min; c) incubação com os Ab₂; d) após as etapas de lavagem, a PM foi modificada com enzimas HRP de modo a formar o bioconjugado HRP-PM-Ab₂.

Adicionou-se uma solução de Ab₂ 10 µg mL⁻¹ preparada em PBS pH 7,4. Em seguida, a mistura foi agitada lentamente por 24 horas à temperatura ambiente para formar o conjugado PM-Ab₂. O conjugado foi separado magneticamente e lavado três vezes com PBS-TW. Na PM-Ab₂, adicionou-se uma solução de HRP 1,2 mg mL⁻¹ preparada em PBS pH 7,0 e deixou-se agitando de 16 a 18h. Nesta etapa, ocorre a formação de uma ligação amida entre as amins do Ab₂ e da HRP e os grupos carboxilas da PM previamente ativados com o EDC. Após essa etapa, a mistura foi separada, descartando-se o sobrenadante, e fez-se sucessivas lavagens com PBS-TW obtendo-se o bioconjugado HRP-PM-Ab₂. O bioconjugado foi então ressuspensão em 1 mL de glicina 1,0 mol L⁻¹ pH 8,0 deixando-se agitar por 30 minutos a fim de bloquear os sítios de ligação livres e evitar ligações não específicas. O conjugado HRP-PM-Ab₂ foi lavado, disperso em 400 µL de tampão PBS-TW e mantido sob refrigeração por até 3 semanas.

3.6.1.3 Captura da ADAM10 na amostra

O diagrama esquemático do processo da captura do biomarcador na amostra está exemplificado na FIGURA 3.7. Para o preparo das soluções padrão contendo o biomarcador ADAM10, 20 μ L do bioconjugado Ab₂-PM-HRP e 20 μ L do padrão diluído em soro de bezerro foram adicionados a 320 μ L de PBS (pH 7,4) a fim de obter a concentração desejada. Para as amostras de plasma e liquor, o mesmo volume de PMs bioconjugadas foi adicionado à solução previamente diluída em PBS pH 7,4.

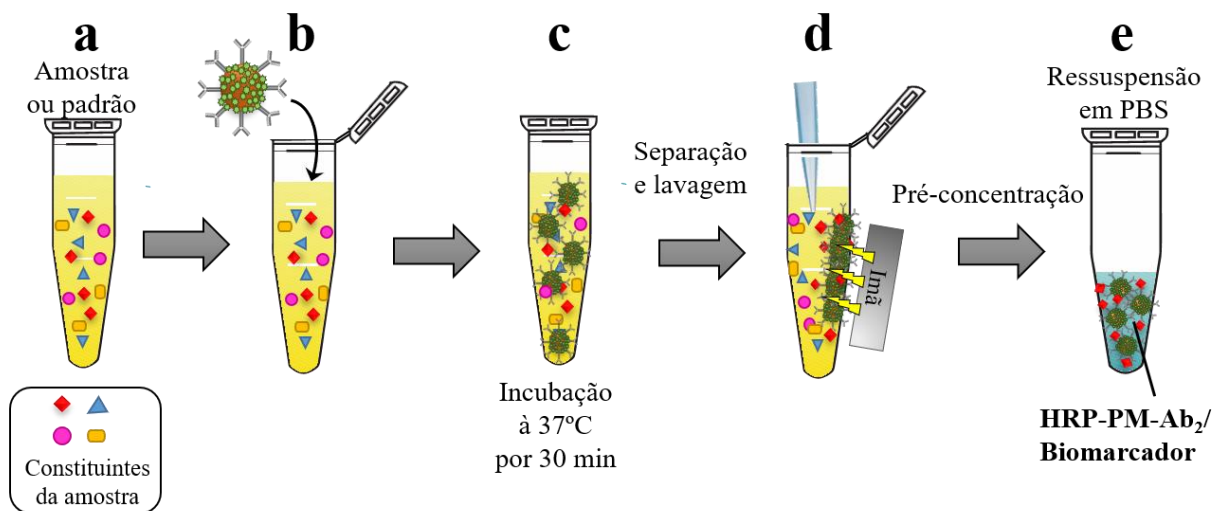


FIGURA 3.7 – Diagrama esquemático da magneto-captura do biomarcador ADAM10 na amostra utilizando bioconjugado HRP-PM-Ab₂: a) amostra contendo o biomarcador e os outros constituintes; b) adição das PMs modificadas; c) incubação para a captura do biomarcador pelos anticorpos; d) separação magnética das PMs contendo o bioconjugado, seguido da lavagem para eliminação dos interferentes; e) ressuspensão do bioconjugado em PBS contendo o biomarcador pré-concentrado.

Essa solução foi misturada e incubada, sob agitação constante e lenta num agitador rotativo, por 30 minutos à 37°C. Em seguida, foram separados magneticamente, lavados três vezes com uma solução de PBS-TW + BSA 0,5% (pH 7,4). Em seguida o sobrenadante foi descartado, e o bioconjugado HRP-PM-Ab₂/ADAM10 foi ressuspenso em 120 µL de PBS-TW + BSA 0,5% para posterior medida eletroquímica.

3.6.1.4 Detecção do biomarcador ADAM10

O dispositivo microfluídico contendo o arranjo de eletrodos modificados com o Ab₁ foi inicialmente condicionado utilizando a solução carreadora de PBS-TW + BSA 0,1% (pH 6,5) por aproximadamente 5 min antes da injeção do bioconjugado. A dispersão de HRP-MB-Ab₂/ADAM10 foi injetada no sistema e o canal microfluídico foi preenchido com a dispersão. O fluxo foi interrompido por 30 min, de modo a permitir que a imunorreação ocorresse e o sanduíche Ab₁/ADAM10/Ab₂-PM-HRP formasse. Após o tempo de incubação, o fluxo foi reiniciado e por meio da passagem da solução carreadora, as PMs não conjugadas foram removidas do canal microfluídico por lavagem. A vazão otimizada foi de 100 µL min⁻¹.

As medidas amperométricas foram realizadas em fluxo aplicando-se um potencial fixo de -0,25 V vs. pseudo-referência de Ag/AgCl em PBS e injetando uma mistura de HQ 2,0 mmol L⁻¹ e H₂O₂ 0,2 mmol L⁻¹ via alça de amostragem de 100 µL. As soluções de HQ e H₂O₂ foram preparadas imediatamente antes do uso em tampão PBS pH 6,5 previamente desaerado com gás N₂. As correntes de pico catódica referente à redução da benzoquinona proporcionais a concentração do biomarcador foram registradas.

3.6.2 Avaliação da constante de afinidade do anticorpo anti- β A42 com a β A42

A modificação das PMs foi realizada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante (Invitrogen) com algumas adaptações. Para este estudo, 20 μ L de PMs foram dispersas em 1 mL de tampão MES 50 mmol L⁻¹ pH 5,2. A dispersão foi separada magneticamente, por meio de um suporte magnético Eppendorfs® com imãs atuando na lateral dos mesmos, e então adicionou-se uma solução mista de EDC 5,0 mg mL⁻¹ e NHS 1,8 mg mL⁻¹ para ativar o grupamento carboxila, deixando em agitação suave por 30 min à temperatura ambiente. A mistura resultante foi novamente separada magneticamente e o sobrenadante foi descartado. As PMs foram lavadas com tampão MES 50 mmol L⁻¹.

Às partículas ativadas, adicionou-se 1 mL de solução de padrão β A42 25 μ g mL⁻¹ preparada em PBS pH 7,4. Em seguida, a mistura foi agitada lentamente por 24 horas à temperatura ambiente para formar o conjugado PM- β A42. Após essa etapa, a mistura foi separada, descartou-se o sobrenadante e fez-se sucessivas lavagens com PBS-TW ao conjugado formado. O PM- β A42 foi então ressuspensão em 1 mL de glicina 1 mol L⁻¹ pH 8,0, para bloquear os sítios de ligação livres, deixando-se agitar por 30 minutos. Por fim, o bioconjugado foi lavado, disperso em 500 μ L de tampão PBS-TW e mantido sob refrigeração.

O estudo da interação do anticorpo anti- β A42 com o β A42 baseou-se no imunoenensaio indireto, conforme representado na FIGURA 3.8.

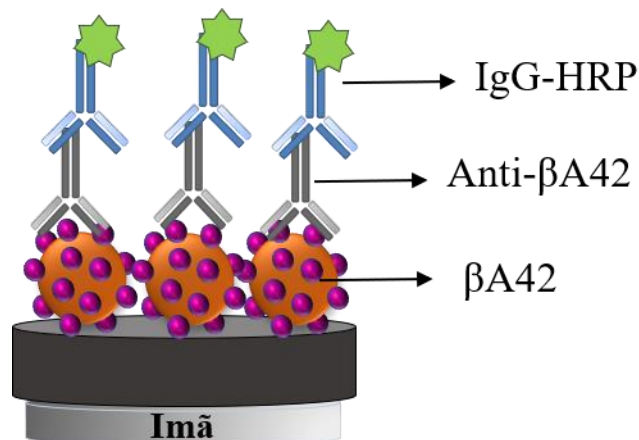


FIGURA 3.8 - Esquema da configuração do imunossensaio indireto para detecção do anticorpo anti- β A42 usando as PMs modificadas com o peptídeo.

Para o ensaio indireto, 20 μ L da dispersão PM- β A42 foram incubadas com soluções do anticorpo com concentrações entre 10 pg mL^{-1} a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 1h a temperatura ambiente. Após essa etapa, o bioconjugado foi lavado três vezes com PBS-TW e então incubado com uma solução de um anti-anticorpo anti-IgG contendo o marcador eletroquímico HRP (IgG-HRP) por mais 1 h.

O bioconjugado obtido foi adicionado ao eletrodo de trabalho sem modificação contendo um ímã, posicionado externamente sob o eletrodo, para manter a imobilização magnética das PMs sobre a superfície do SPCE.

As medidas amperométricas foram feitas aplicando um potencial fixo de -0,25 V *vs.* pseudo-referência de Ag/AgCl em PBS e injetando uma mistura de HQ 2,0 mmol L^{-1} e H_2O_2 0,2 mmol L^{-1} via alça de amostragem de 100 μ L. As soluções de HQ e H_2O_2 foram preparadas imediatamente antes do uso em tampão PBS pH 6,5 previamente desaerado com N_2 . As respostas transientes de correntes obtidas devido a presença do marcador enzimático foram registradas e avaliadas frente a concentração do anticorpo nas soluções padrões.

3.6.3 Ensaio competitivo para determinação do biomarcador β A42

O ensaio competitivo para detecção da β A42 foi necessário porque o peptídeo possui baixa massa molecular e não mais que um epítopo, impossibilitando um ensaio do tipo sanduíche^{126,127}. O que foi confirmado via consulta aos principais fornecedores, que não garantiram a possibilidade de detecção com mais de um anticorpo.

O desenvolvimento do imunossensor baseado na competição indireta do biomarcador também foi dividido em três etapas, conforme a FIGURA 3.9. Neste ensaio, duas estratégias foram utilizadas, a primeira usando as PMs decoradas com o anticorpo de detecção (IgG) e enzimas HRP (IgG-PM-HRP) e a segunda o anticorpo comercial adquirido já conjugado com a HRP (IgG-HRP), sem PMs.

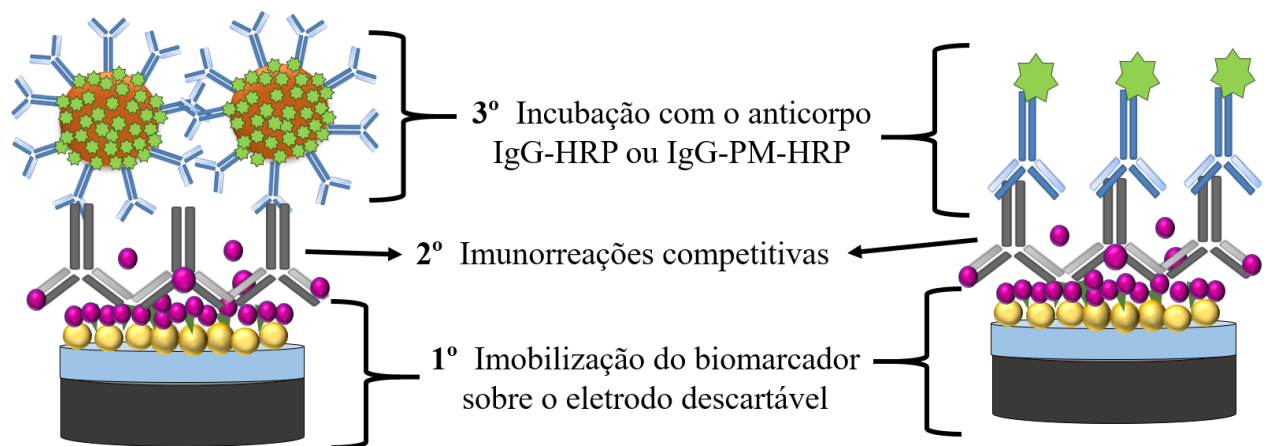


FIGURA 3.9 - Esquema da construção do imunossensor baseado no ensaio competitivo indireto usado para detecção as PMs decoradas com o anticorpo IgG e HRP (esquerda) ou o anticorpo IgG-HRP (direita).

Inicialmente foi realizada a modificação dos eletrodos de trabalho ancorando o peptídeo β A42 na sua superfície. A segunda etapa consistiu em adicionar uma solução mista de anticorpo anti- β A42 (concentração fixa) e padrão β A42 (concentrações variadas) para que ocorresse as imunorreações competitivas entre os biomarcadores livres e imobilizados. Na terceira e última etapa, foi utilizado como esquema de detecção o bioconjugado IgG-PM-HRP ou anticorpo de detecção IgG-HRP.

3.6.3.1 Modificação do eletrodo de trabalho

A modificação dos eletrodos de carbono também foi realizada por meio de filmes *LbL* formados por PDDA e AuNPs-GSH e a imobilização covalente do peptídeo β A42 (FIGURA 3.10). Para isto, os eletrodos de carbono foram lavados com água e colocados em uma placa de Petri contendo papel absorvente umedecido. Sobre os eletrodos de trabalho foram adicionados 5 μ L de uma solução contendo PDDA 2,0 mg mL⁻¹ preparada em NaCl 0,05 mol L⁻¹ e deixados por 20 minutos. Após esse tempo, os eletrodos modificados foram lavados cuidadosamente com água. 5 μ L da dispersão AuNPs-GHS foram adicionadas sobre cada eletrodo de trabalho e mantidos por mais 20 minutos. Em seguida, o excesso AuNPs-GHS foi retirado da superfície do eletrodo por retropipetagem.

Uma vez que a superfície dos eletrodos foi modificada com o filme *LbL*, para a imobilização do peptídeo β A42, foram adicionados 5 μ L de uma solução recém preparada de EDC 0,4 mol L⁻¹ em solução aquosa de NHS 0,1 mol L⁻¹, que foi deixada por 10 minutos, para a ativação dos grupos carboxílicos. Após esse tempo, o eletrodo foi mergulhado três vezes em um béquer contendo água para a lavagem, e seco cuidadosamente com papel absorvente. Em seguida, 5 μ L da solução do biomarcador β A42 1,0 μ g mL⁻¹ preparada em tampão PBS 10 mmol L⁻¹ pH 7,4,

foram adicionados e deixado por 18 horas à 4 °C para a completa imobilização da biomolécula sobre o eletrodo.

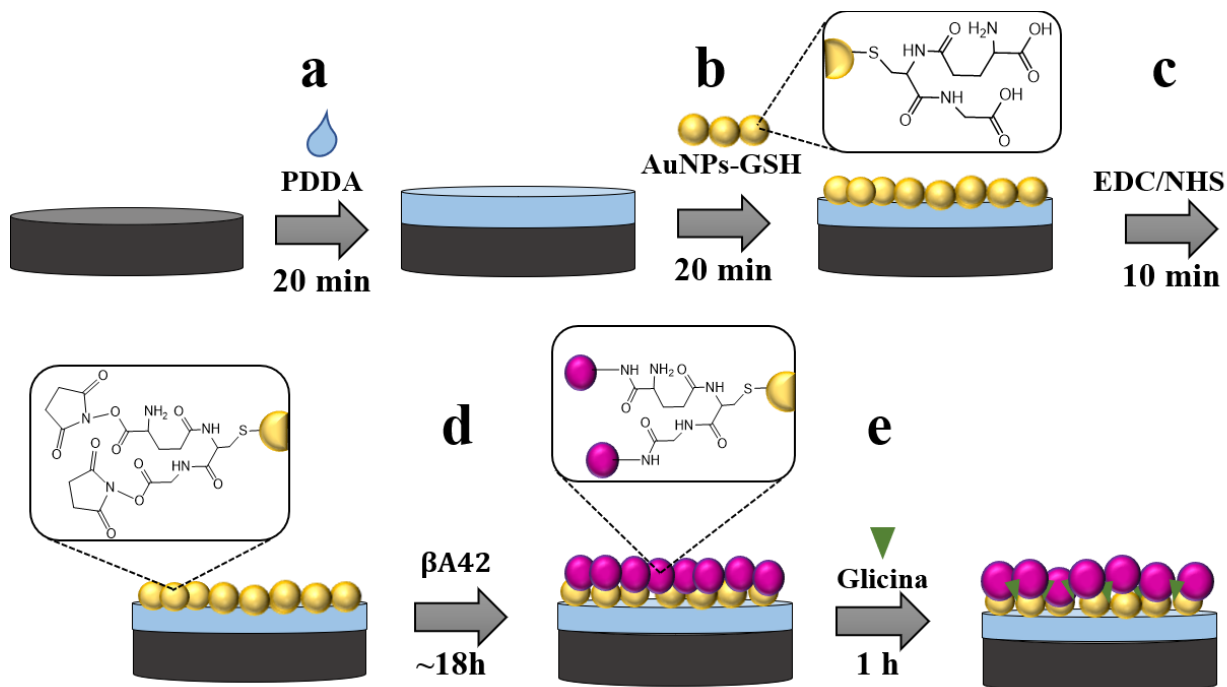


FIGURA 3.10 - Esquema da modificação dos eletrodos de trabalho por meio do filme *LbL* de PDDA e AuNPs-GSH e imobilização da β A42. a) Adição da solução de PDDA sobre a superfície do eletrodo de trabalho; b) Adição das AuNPs-GSH; c) Uma solução mista de EDC/NHS foi adicionada para ativação dos grupos carboxílicos da GSH; d) Em seguida, uma solução de β A42 foi adicionada e deixada por aproximadamente 18h; e) Finalização do preparo do eletrodo com a adição de glicina para bloqueio dos sítios de ligação livres.

Por fim, os eletrodos foram lavados com PBS-TW e bloqueados por 1 hora com solução de glicina 1,0 mol L⁻¹, a fim de evitar reações não específicas. Os eletrodos foram lavados com tampão PBS-TW pH 7,4 e armazenado sob refrigeração.

3.6.3.2 Modificação das PMs com o anticorpo IgG e HRP

Uma alíquota de 20 μL das PMs modificadas com grupo carboxila (Dynabeads® MyOne™) foi dispersa em 1 mL de tampão MES 50 mmol L^{-1} pH 5,2. A dispersão foi separada magneticamente por meio de um suporte magnético, e, então, adicionou-se uma solução mista de EDC (3,2 mg mL^{-1}) e NHS (1,8 mg mL^{-1}) para ativar o grupamento carboxila, deixando em agitação leve por 30 min à temperatura ambiente. A mistura resultante foi novamente separada magneticamente e o sobrenadante foi descartado e lavado com tampão MES 50 mmol L^{-1} .

Adicionou-se 1 mL da solução de anticorpo IgG 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparada em PBS pH 7,4. Em seguida, a mistura foi agitada por 24 horas à temperatura ambiente para formação do conjugado PM-IgG. O conjugado foi separado magneticamente e lavado com PBS-TW. Adicionou-se uma solução de 1,2 mg mL^{-1} de HRP preparada em PBS pH 7,0. Após essa etapa, a dispersão foi separada, descartou-se o sobrenadante e fez-se sucessivas lavagens com PBS-TW ao bioconjugado formado (IgG-PM-HRP). As partículas modificadas foram então ressuspensas em 1 mL de glicina 1 mol L^{-1} pH 8,0 para bloquear os sítios de ligação livres, deixando-se agitar por 30 minutos. O bioconjugado resultante foi lavado, disperso em 400 μL de tampão PBS-TW e mantido sob refrigeração.

3.6.3.3 Detecção do biomarcador βA42

O dispositivo microfluídico contendo o arranjo de eletrodos modificados foi condicionado com PBS-TW (pH 6,5) utilizado com carreador por aproximadamente 5 min.

Em um microtubo, adicionaram-se 5,0 μL de soro de bezerro comercial, 2,5 μL de anticorpo monoclonal 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração final 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e

92,5 μL da βA42 diluída em PBS pH 7,4 na concentração desejada (para volume final de 100 μL). Para as amostras de plasma e líquor, a mesma concentração de anticorpo anti- βA42 foi utilizada e a amostra foi previamente diluída em PBS pH 7,4. A solução foi injetada imediatamente no dispositivo microfluídico e incubada por 1 h de forma a ocorrer as reações competitivas. Após essa etapa, lavou-se o canal microfluídico com PBS-TW de forma a eliminar os anticorpos não ligados a βA42 imobilizada no eletrodo.

Para a detecção, utilizou-se as estratégias com o bioconjugado IgG-PM-HRP ou anticorpo de detecção IgG-HRP (FIGURA 3.11). O anticorpo secundário foi incubado por 90 min.

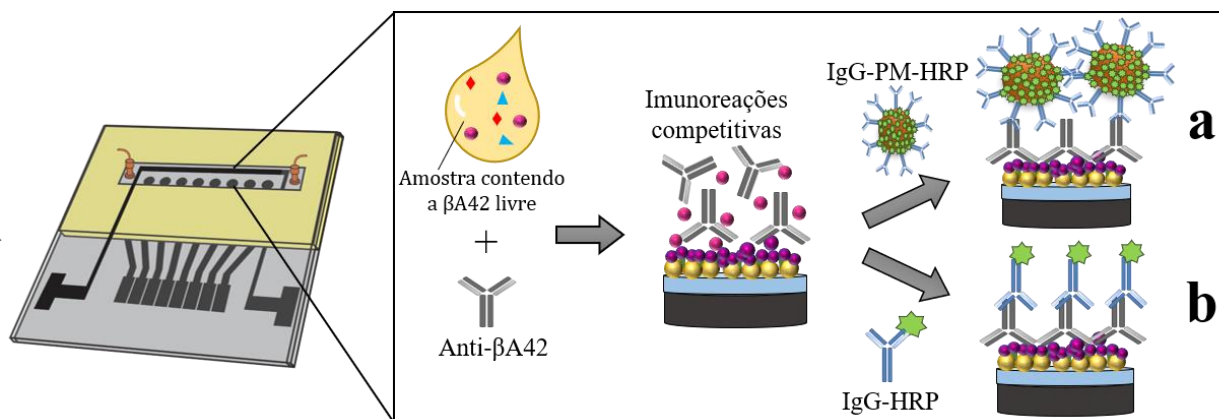


FIGURA 3.11 - Diagrama esquemático das etapas do ensaio competitivo indireto baseado no uso da a) IgG-PM-HRP e b) IgG-HRP.

Após a etapa de incubação, o fluxo foi reiniciado a fim de remover as partículas ou anticorpos não ligados. As medidas amperométricas foram realizadas aplicando um potencial fixo de $-0,25\text{ V vs. pseudo-referência de Ag/AgCl}$ em PBS e injetando uma mistura de HQ $2,0\text{ mmol L}^{-1}$ e H_2O_2 $0,2\text{ mmol L}^{-1}$ via alça de amostragem de $100\text{ }\mu\text{L}$. As soluções de HQ e H_2O_2 foram preparadas imediatamente antes do uso em tampão PBS pH 6,5 previamente desaerado com gás N_2 . As respostas

transientes de corrente foram registradas e avaliadas frente as diferentes concentrações do biomarcador.

3.7 Participantes

Os níveis dos biomarcadores estudados foram detectados em amostras de sangue e líquor de idosos divididos em duas coortes de indivíduos (Tabela 3.1 e 3.2).

3.7.1 Coorte 1

Amostras de plasma humano foram cedidas pelo Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) sob a coordenação da Profa. Dra. Márcia Cominetti. O sangue de idosos com idade igual ou superior a 60 anos foi obtido dos serviços de saúde do município de São Carlos/SP. Todos os procedimentos éticos foram seguidos, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), nº 427/2009.

As amostras foram divididas em três grupos: 1) CT: indivíduos controles saudáveis, sem sinais ou sintomas de declínio cognitivo ou doença neurológica; 2) TNCL: pacientes com diagnóstico de TNCL, com Classificação Clínica de Demência (CDR, do inglês *Clinical Dementia Rating*) 0,5¹²⁸, teste de Pfeffer¹²⁸ sem comprometimento e seguem os critérios de Petersen¹²⁸; e 3) DA: pacientes diagnosticados com provável DA em diferentes estágios: leve (DA1), moderada (DA2) e avançada (DA3), de acordo com a CDR¹²⁸ e com os critérios do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*²⁹.

As amostras foram coletadas em tubos contendo solução de citrato de sódio (3,8%) e glicose (136 mmol L⁻¹). Após as coletas, os tubos foram mantidos a temperatura de 4 °C durante o período de armazenamento e transporte. Os tubos, imediatamente após a coleta, foram misturados por inversão e então centrifugados a 1.200 rpm por 10 minutos, obtendo-se assim o plasma rico em plaquetas (PRP). A partir do PRP, as plaquetas foram coletadas por centrifugação a 2.400 rpm por 10 minutos. O plasma residual sem plaquetas foi armazenado a -80 °C antes do ensaio.

3.7.2 Coorte 2

A coorte 2 consistiu em amostras de liquor e soro de indivíduos cognitivamente saudáveis e de doentes com TNCL e DA. As amostras foram obtidas de sujeitos com mais de 55 anos acompanhados pela Policlínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP) sob coordenação do Prof. Dr. Marcio L. F. Balthazar. Os controles saudáveis foram identificados como sendo cognitivamente normais, não apresentavam nenhuma queixa de memória ou distúrbio neurológico ou psiquiátrico. Os sujeitos apresentaram desempenhos normais no Mini Exame do Estado Mental (MEEM)¹²⁹, com CDR igual a zero. Todos os participantes com TNCL tiveram uma pontuação de CDR de 0,5. O diagnóstico de provável demência por DA seguiu os mesmos critérios estabelecidos na coorte 1²⁹.

O Comitê de Ética em Pesquisa Médica do Hospital da UNICAMP aprovou o estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes antes do início do estudo (dos sujeitos ou de seus cuidadores responsáveis, se incapaz), de acordo com a Declaração de Helsinki¹³⁰.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos para separar o soro. Amostras de liquor foram centrifugadas a 700 rpm por

10 minutos. Ambos os processos de centrifugação foram realizados à 4 °C e posteriormente separados em microtubos e armazenados à -80 °C até o momento da análise.

TABELA 3.1 - Coorte 1: Variáveis demográficas e clínicas dos sujeitos.

Variável	CT	TNCL	DA1	DA2	DA3
Casos (n/%)	10/22	10/22	10/22	8/18	7/16
Média da idade (faixa)	73(65-86)	69 (60-78)	75 (66-84)	79 (69-89)	71 (60-90)
Gênero feminino (%)	80	50	80	63	43

CT: Sujeitos controles (saudáveis); TNCL: Pacientes com transtorno neurocognitivo leve; DA: Pacientes com Doença de Alzheimer

TABELA 3.2 - Coorte 2: Variáveis demográficas e clínicas dos sujeitos.

Variável	CT	TNCL	DA	Valor de corte¹³¹ (pg/mL)
Casos (n/%)	8/33.3	7/29.2	9/37.5	
Média da idade (faixa)	64 (57-69)	71 (65-81)	73 (59-81)	
Gênero feminino (%)	100	71	78	
β A42 Liquor (pg/mL)	541.8 \pm 302.2	530.3 \pm 365.2	334.8 \pm 118.9	<416.0
tTau Liquor (pg/mL)	80.3 \pm 38.4	103.3 \pm 32.8	139.8 \pm 81.5	>76.7
pTau Liquor (pg/mL)	35.0 \pm 16.6	38.2 \pm 9.7	58.8 \pm 33.7	>36.1

CT: Sujeitos controles (saudáveis); TNCL: Pacientes com transtorno neurocognitivo leve; DA: Pacientes com Doença de Alzheimer;
tTau: proteína Tau total; pTau: proteína Tau fosforilada

3.8 Método comparativo para determinação dos biomarcadores

Os níveis dos biomarcadores ADAM10 e β A42 nas amostras de sangue e liquor foram comparados com um segundo método. Os testes estatísticos foram avaliados por meio do Software MedCalc Statistical.

Para as amostras da coorte 1 um kit ELISA comercial da Cloud-Clone Corp. (Produto nº SEA766Hu, Houston, USA) foi utilizado. As amostras não necessitaram de uma diluição prévia e a medida foi feita em leitora de ELISA Labtech LT-4000 (Labtech International Ltd, Uckfield, UK) em 450 nm. O ensaio foi realizado pela Dra. Patricia Regina Manzine Morales do LABEN/UFSCar.

As concentrações do peptídeo β A42, pTau e tTau nas amostras de liquor foram quantificados usando uma plataforma multiplexada Luminex[®] 100IS (Luminex, Austin, TX, EUA) baseada em microesferas multiplexadas que permite a análise simultânea de três biomarcadores. Medidas da β A42, pTau e tTau foram realizadas usando kits comerciais Fujirebio (USA) β A42 (INNOTEST[®] β -amyloid(1-42) (96T)), pTau (INNOTEST[®] (181P)) e tTau (INNOTEST[®] hTAU Ag). O ensaio foi realizado pela MSc. Thamires N. C. Magalhães da FCM/UNICAMP.

3.9 Tratamento estatístico dos dados

Os testes estatísticos para avaliação dos resultados foram calculados/analísados pelos programas MedCalc statistical software, GraphPad Prisma 7 e OriginPro 8.6. A curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) foi utilizada para avaliar a sensibilidade e especificidade do imunossensor. A curva ROC é uma importante ferramenta que permite avaliar a

precisão na tomada de decisões para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico^{132,133}. Para construir uma curva ROC, traça-se um diagrama que represente a sensibilidade (verdadeiros positivos) em função de 100-especificidade (falsos positivos) para um conjunto de valores de "ponto de corte"¹³⁴. A sensibilidade é a capacidade do teste detectar amostras verdadeiramente positivas, ou seja, diagnosticar corretamente as amostras dos pacientes com DA, e é calculada como:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Falsos negativos} + \text{Verdadeiros positivos}}$$

A especificidade é a capacidade do teste detectar os falsos positivos, ou seja, classificar corretamente as amostras dos indivíduos saudáveis.

$$100 - \text{Especificidade (\%)} = \frac{\text{Falsos positivos}}{\text{Verdadeiros negativos} + \text{Falsos positivos}}$$

A área sob a curva ROC (AUC, do inglês *area under the curve*) é a medida da exatidão do teste diagnóstico, isto é, quanto mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do diagrama, melhor é sua discriminação entre indivíduos com e sem a doença. A AUC é dada em valores entre 0 e 1, no qual um valor de 0 indica um teste sem nenhuma precisão, enquanto que AUC igual a 1 possui zero falsos positivos e zero falsos negativos, ou seja, um teste perfeitamente preciso⁸⁵.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização microscópica do eletrodo de trabalho modificado

A morfologia do eletrodo de carbono e das etapas de modificação com o filme *LbL* de PDDA e AuNPs-GSH foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Imagens de MEV do SPCE sem modificação e após as modificações com PDDA (SPCE/PDDA) e AuNPs-GSH (SPCE/PDDA/AuNPs-GSH) são mostradas na FIGURA 4.1.

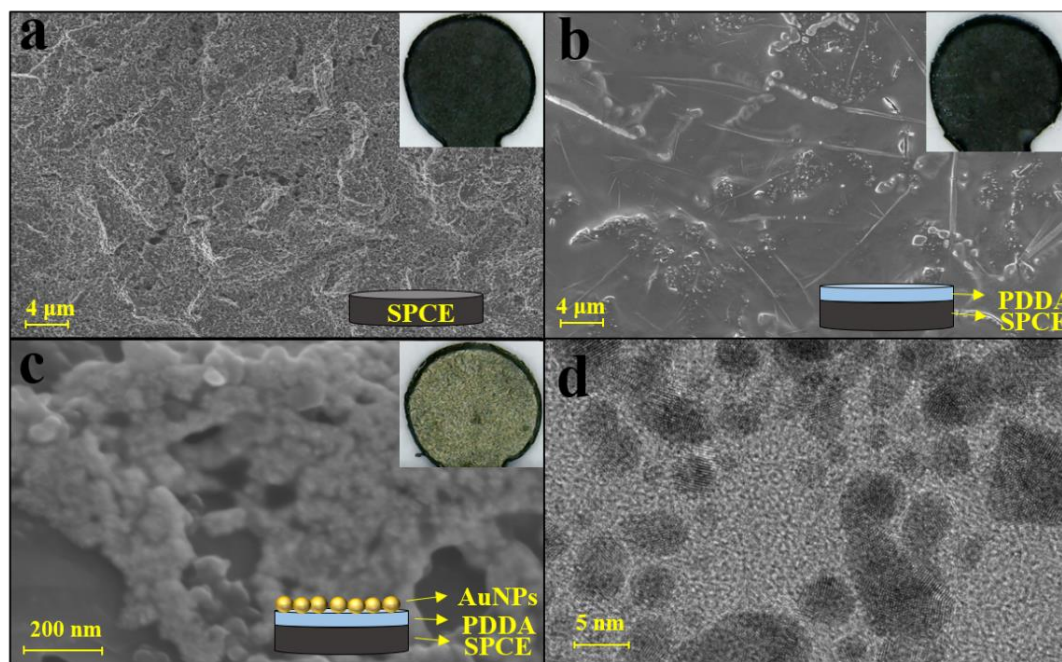


FIGURA 4.1 - Imagens de MEV do eletrodo de trabalho: a) SPCE sem modificação e modificados com: b) SPCE/PDDA e c) SPCE/PDDA/AuNPs. Inserção: imagens dos eletrodos antes e após as modificações tiradas com um microscópio óptico portátil digital. d) Imagem de MET das AuNPs-GSH.

Conforme apresentado na FIGURA 4.1a, o SPCE apresentou uma morfologia típica de eletrodos a base de tinta de grafite com estrutura rugosa⁹⁵. Ao se adicionar o polímero PDDA, há a formação de um filme sobre o SPCE (FIGURA 4.1b), apresentando uma superfície mais lisa¹³⁵. Ao adicionarmos as AuNPs-GSH, aglomerados de nanopartículas se formaram (FIGURA 4.1c), alterando a superfície do eletrodo. Além disso, um aspecto dourado na superfície do eletrodo (FIGURA 4.1c, inserto) pode ser observado após a etapa modificação com as AuNPs-GSH, confirmando a bicamada *LbL* formada sobre o eletrodo de trabalho. Na FIGURA 4.1d observa-se a imagem de MET para a dispersão coloidal de AuNPs-GSH utilizada para modificar os eletrodos, no qual pode-se observar partículas com aproximadamente 5 nm de diâmetro, conforme já descrito por Mani e colaboradores¹¹⁸.

4.2 Detecção dos biomarcadores utilizando a HRP com marcador enzimático

O sinal analítico do biomarcador foi dado indiretamente por meio da enzima HRP como marcador eletroquímico. Na FIGURA 4.2 está representado o esquema do ciclo eletrocatalítico da enzima HRP na presença do substrato H_2O_2 e do mediador redox HQ. Como observado, a enzima HRP_{red} é oxidada pelo seu substrato H_2O_2 , que é então reduzida a sua forma nativa promovendo a oxidação da hidroquinona para benzoquinona¹¹⁸. A benzoquinona é reduzida na superfície do eletrodo durante a aplicação de um potencial de -0,25 V por meio da transferência de dois elétrons e dois prótons.

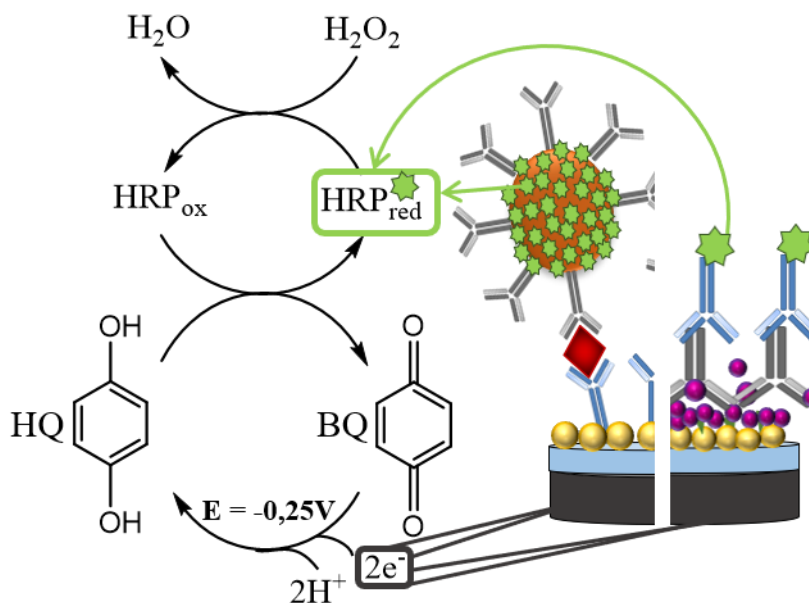


FIGURA 4.2 - Representação esquemática do ciclo catalítico da enzima HRP na superfície do eletrodo modificado. HRP_{red} = enzima HRP reduzida (forma nativa), HRP_{ox} = HRP oxidada.

4.3 Determinação do biomarcador ADAM10

A técnica de amperometria foi utilizada para detecção dos biomarcadores neste trabalho. Para a medida amperométrica, um potencial de -0,25 V foi aplicado durante a passagem da solução de PBS-TW + BSA 0,1% (pH 6,5) pelo canal microfluídico. Os sinais transientes de corrente foram obtidos simultaneamente para os oito eletrodos do arranjo ao injetar uma solução mista de H₂O₂ 0,2 mmol L⁻¹ e HQ 2,0 mmol L⁻¹ em PBS pH 6,5.

A FIGURA 4.3 apresenta o perfil referente aos sinais transientes de corrente obtidos para o branco (linha vermelha) e 555 fg mL⁻¹ de ADAM10 (linha preta). Ao estabilizar a corrente, foram injetados 100 μL da solução mista de H₂O₂ e HQ obtendo-se os sinais referente a medida amperométrica. Nota-se uma maior

intensidade da corrente obtida para a amostra contendo a ADAM10 quando comparado ao branco analítico. O sinal de corrente obtido para o branco pode ser atribuído à ligações não específicas das partículas magnéticas modificadas⁸⁵ somado ao processo de oxidação do próprio mediador pelo substrato na superfície do SPCE.

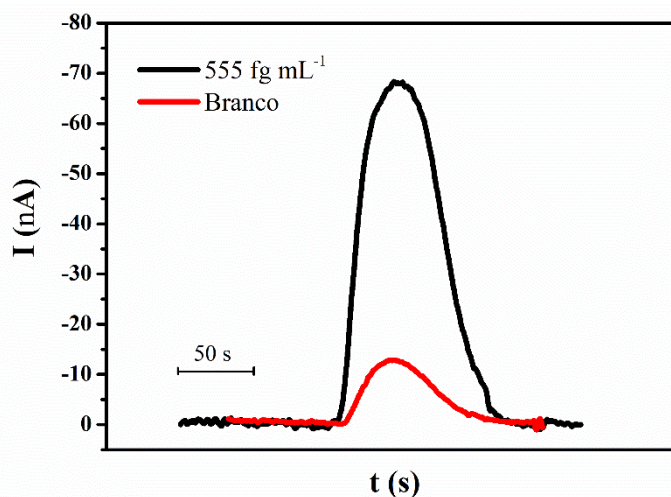


FIGURA 4.3 - Sinais transientes de corrente obtidos para a ADAM10 555 fg mL^{-1} e branco analítico por meio da solução carreadora de PBS-TW + BSA 0,1% com injeção de uma mistura H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Tempo de incubação de 30 min e potencial aplicado de $-0,25 \text{ V}$.

4.3.1 Estudo das condições experimentais

A vazão da solução carreadora durante a medida amperométrica e o tempo de incubação do conjugado HRP-PM-Ab₁/ADAM10 no dispositivo contendo o Ab₁ imobilizado na superfície do eletrodo foram estudados.

O fluxo da solução carreadora PBS-TW + BSA 0.1% durante a medida amperométrica foi avaliado por meio de diferentes vazões, sendo elas de 50, 100 e $200 \mu\text{L min}^{-1}$. Os resultados estão apresentados na FIGURA 4.4.

Como observado na FIGURA 4.4a, na vazão de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ obteve-se um pico alargado com menor valor de corrente. Esse efeito foi atribuído ao maior tempo de retenção da solução dentro do microcanal. Já na vazão de $200 \mu\text{L min}^{-1}$ o sinal da corrente de pico diminuiu consideravelmente. Supõe-se que, como a solução mista de HQ e H_2O_2 passa relativamente rápida pelos eletrodos modificados com HRP, o ciclo catalítico não ocorre em grande extensão, levando a uma menor produção enzimática de BQ e, conseqüentemente, a uma menor resposta de corrente, o que diminui o pico amperométrico observado. Já a vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ apresentou uma corrente de pico com boa resolução e pouco alargamento. Desta maneira, $100 \mu\text{L min}^{-1}$ foi a vazão selecionada uma vez que apresentou maior resposta para o sistema proposto (FIGURA 4.4b).

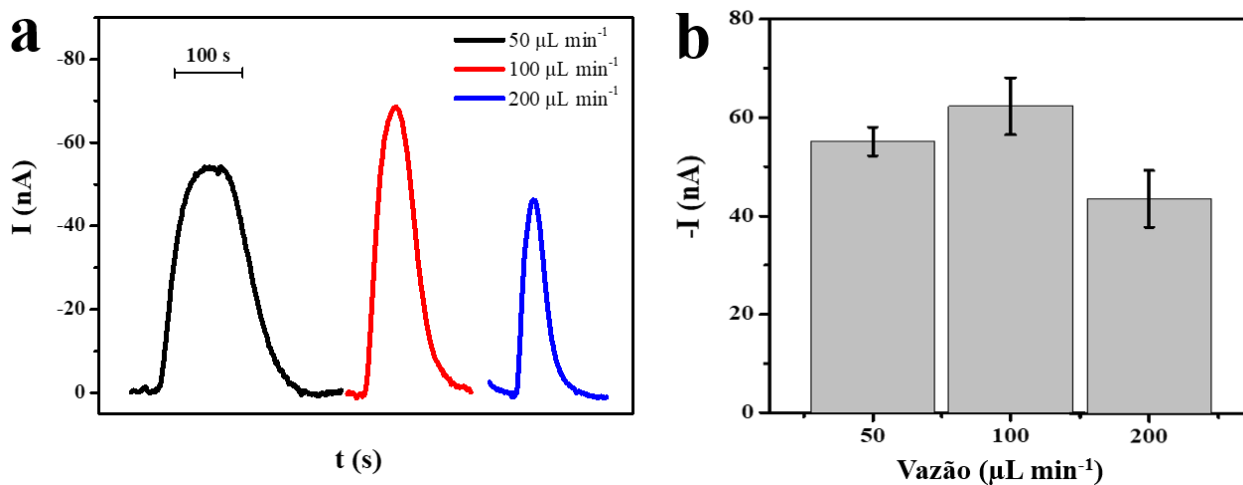


FIGURA 4.4 - a) Sinais transientes de corrente obtidos para a ADAM10 555 fg mL^{-1} em diferentes vazões da solução carreadora PBS-TW + BSA 0,1% com injeção de uma mistura H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Tempo de incubação de 30 min e potencial aplicado de $-0,25 \text{ V}$. b) Gráfico das correntes resultantes da ADAM10 variando a vazão da solução carreadora em 50, 100 e $200 \mu\text{L min}^{-1}$.

O tempo de incubação é diretamente responsável pela formação da estrutura tipo sanduíche na superfície do imunossensor. Diferentes tempos de incubação do bioconjugado HRP-PM-Ab₁/ADAM10 no dispositivo microfluídico também foram estudados, variando o tempo em 10, 20 e 30 minutos. Os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 4.5. Uma maior corrente de pico foi obtida quando o biomarcador foi incubado por 30 min, indicando que esse tempo foi o suficiente para que ocorresse a interação antígeno-anticorpo. Esse tempo foi selecionado para as próximas medidas. Tempos maiores que 30 minutos não foram estudados, uma vez que as análises tornar-se-iam relativamente longas. Além disso, tempos maiores que 30 min podem levar a processos de dissociação entre o complexo antígeno-anticorpo⁹⁵.

O tempo total de ensaio entre a captura/incubação da ADAM10 pelos anticorpos e a medida eletroquímica foi de aproximadamente 70 min.

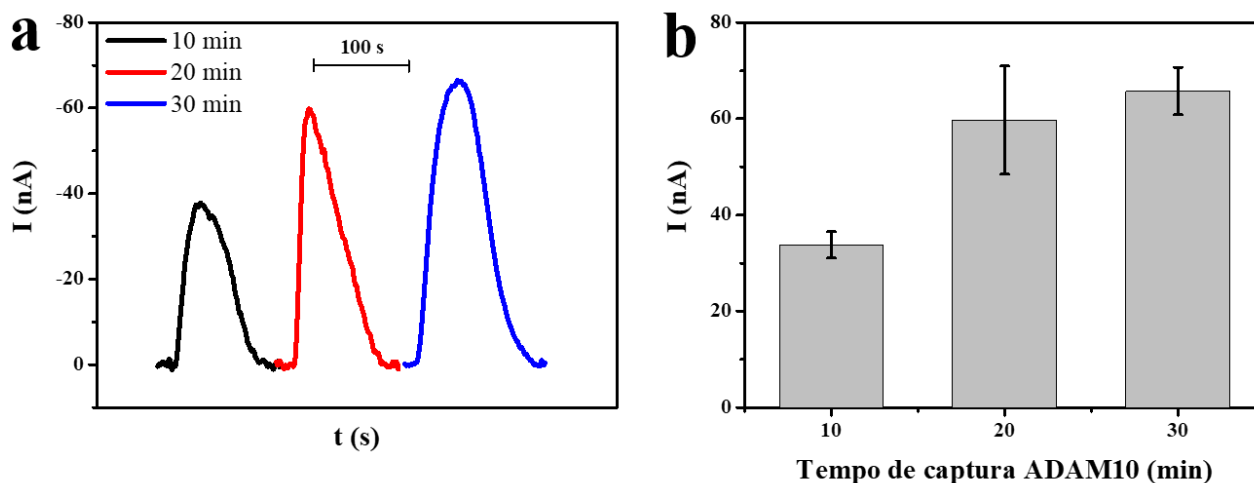


FIGURA 4.5 - a) Sinais transientes de corrente obtidos para a ADAM10 555 fg mL^{-1} em diferentes tempos de incubação com injeção de uma solução mista de H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ e potencial de $-0,25 \text{ V}$. b) Gráfico das correntes resultantes variando o tempo de incubação do bioconjugado HRP-PM-Ab₁/ADAM10 no canal microfluídico.

4.3.2 Desempenho analítico do dispositivo microfluídico para determinação do biomarcador ADAM10

A quantificação de ADAM10 foi realizada em soluções padrão preparadas em meio de soro de bezerro, uma vez que essa consiste em uma matriz complexa, apresentando composição similar ao soro humano. Utilizou-se um novo dispositivo descartável para a medição em cada diferente concentração.

O imunossensor forneceu picos com elevada relação sinal/ruído para a proteína ADAM10, com desvio padrão relativo (RSD) de 5,8% para um arranjo de oito eletrodos (FIGURA 4.6), demonstrando excelente precisão intra-dispositivo. A repetitividade inter-dispositivo apresentou um RSD inferior a 8%.

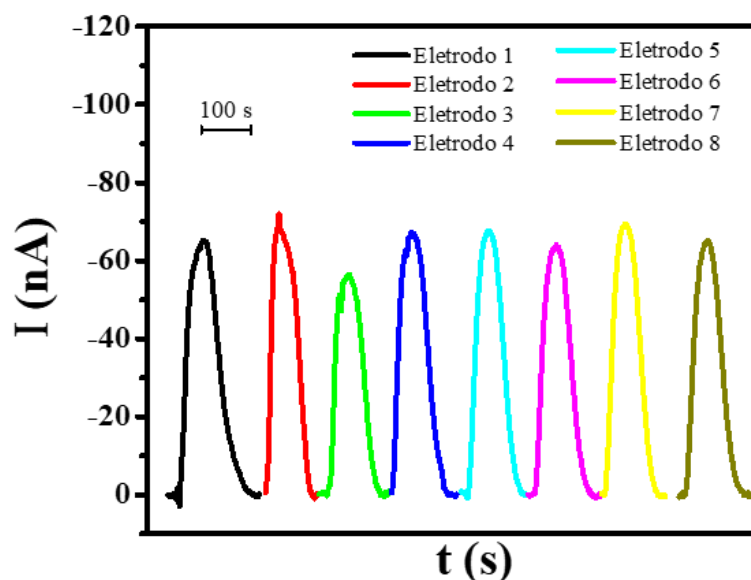


FIGURA 4.6 - Sinais transientes para a ADAM10 555 fg mL^{-1} obtidos para um arranjo microfluídico de 8 eletrodos. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, potencial de $-0,25 \text{ V}$ e solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

A curva analítica obtida é apresentada na FIGURA 4.7a, sendo que o valor do branco já foi devidamente subtraído dos resultados obtidos. Como pode-se observar as correntes de pico aumentaram linearmente com o logaritmo da concentração de ADAM10 numa faixa de 5,6 fg mL⁻¹ a 1,4 pg mL⁻¹. O limite de detecção (LD) foi considerado como sendo o primeiro ponto da curva analítica, neste caso de 5,6 fg mL⁻¹.

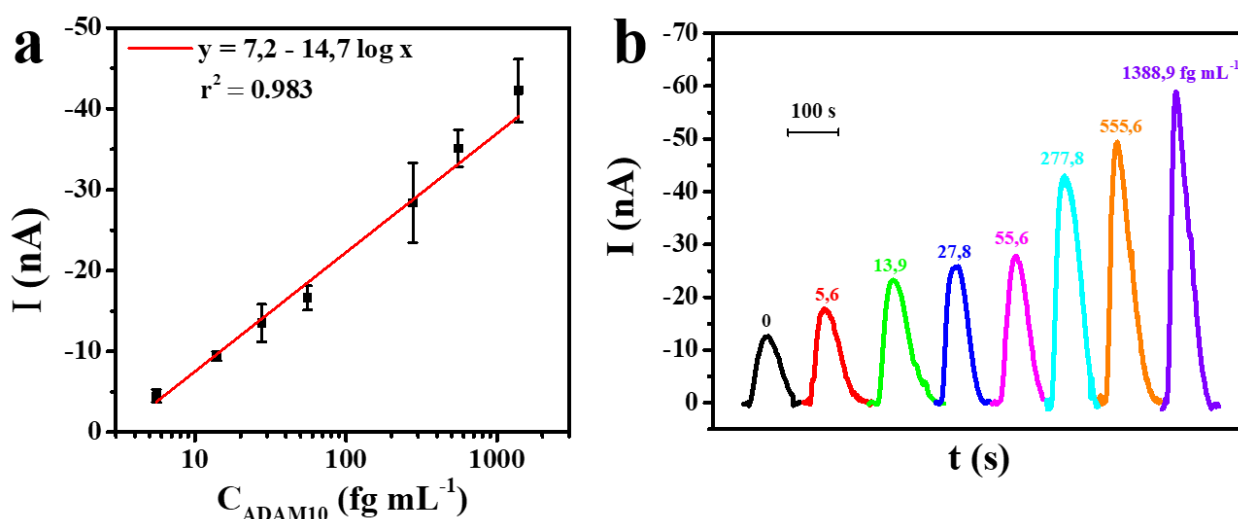


FIGURA 4.7 - a) Curva analítica para o biomarcador ADAM10 ($n \geq 5$). b) Respostas transientes de corrente obtidas para diferentes concentrações de ADAM10. Vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, potencial de -0,25 V e solução de detecção H_2O_2 0,2 mmol L⁻¹ e HQ 2,0 mmol L⁻¹.

A equação da reta obtida, referente a curva analítica, foi igual a I (nA) = $7,2 (\pm 1,0) - 14,7 (\pm 0,8) \times \log [\text{ADAM10}]$ (fg mL⁻¹), com coeficiente de correlação linear (r^2) igual a 0,983 e sensibilidade analítica de 14,7 nA mL fg⁻¹ log [ADAM10]. A boa precisão do dispositivo pode ser observada pelas pequenas barras de erro obtidas. Os sinais transientes de corrente utilizados para a construção da curva analítica estão apresentados na FIGURA 4.7b. A capacidade do imunoensaio detectar

concentrações muito baixas do biomarcador oferece ao paciente um recurso menos invasivo devido ao pequeno volume de amostra necessário para realizar a análise.

4.3.3 Determinação da ADAM10 em amostras de plasma humano

Amostras de plasma da coorte 1 foram avaliadas utilizando o imunoenensaio desenvolvido. A coorte 1 inclui 10 amostras de indivíduos saudáveis, 10 com TNCL e 25 de pacientes com DA em diferentes estágios (leve, moderado e avançado). A elevada sensibilidade do dispositivo permitiu uma grande diluição das amostras dos pacientes, o que é importante para diminuir ligações não específicas e eliminar a interferência de constituintes presentes no plasma. Assim, as amostras foram diluídas 40.000 vezes em PBS.

A quantificação de ADAM10 nas amostras foi também realizada com o ensaio imunoenzimático ELISA para fins de comparação com o método proposto. Os níveis de ADAM10 encontrados pelos dois métodos são apresentados na FIGURA 4.8 separadamente para cada grupo da coorte 1. Ambos os métodos apresentaram concentrações de ADAM10 similares para todos os sujeitos avaliados, demonstrando boa concordância entre os valores obtidos com excelente exatidão. Para os grupos estudados não foi observado diferença significativa entres os dois métodos (teste t , $p = 0,72$).

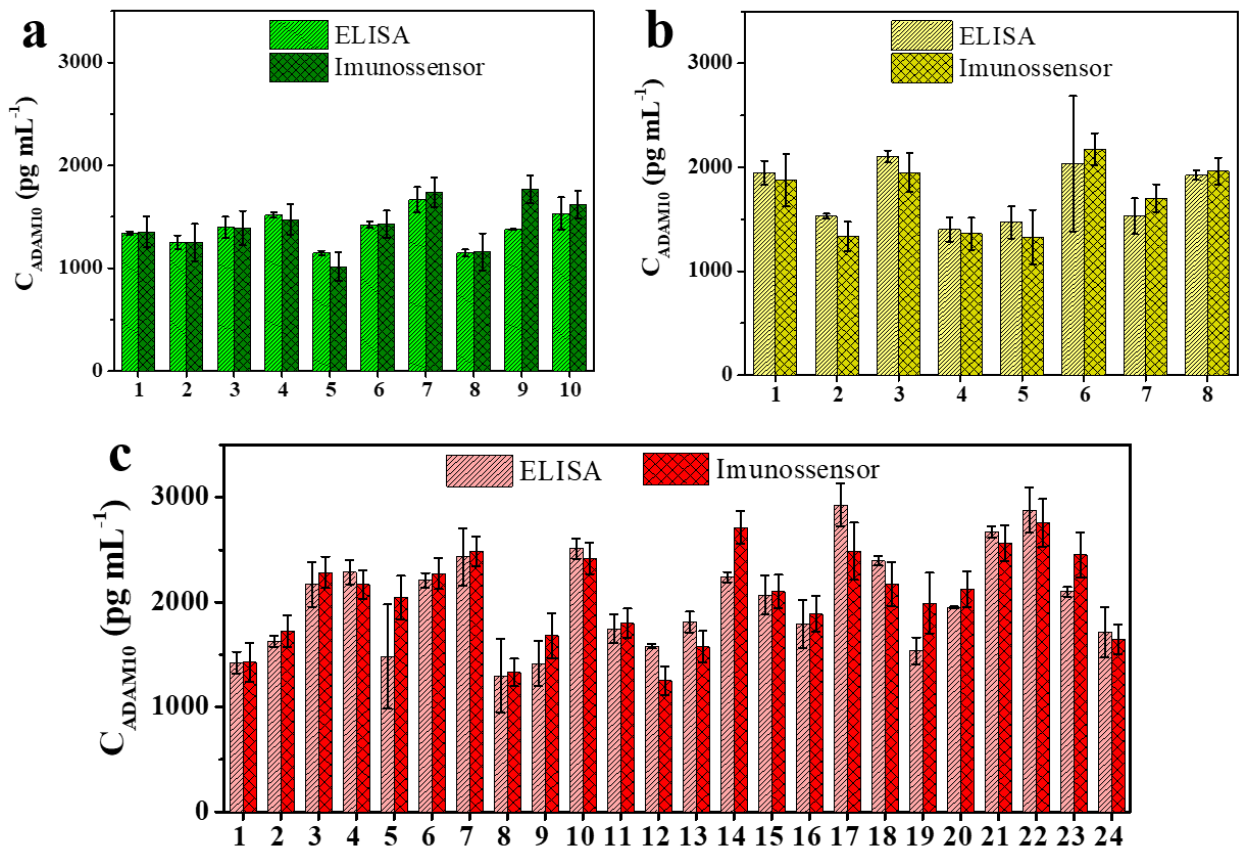


FIGURA 4.8 - Gráficos de barra para as concentrações obtidas da proteína ADAM10 em plasma humano determinadas usando o imunoenensaio proposto e o método comparativo ELISA. Resultados dos grupos a) CT, b) TNCL e c) DA.

Tendo como base os resultados obtidos, avaliou-se o uso do dispositivo para diferenciar os níveis de ADAM10 nos sujeitos CT dos pacientes com TNCL, DA1, DA2 e DA3, a fim de se avaliar a aplicação do método para o diagnóstico da DA. Os valores das concentrações médias de ADAM10 e respectivos desvios padrão foram de 1419 ± 242 pg mL⁻¹ para as amostras dos controles saudáveis, 1700 ± 294 pg mL⁻¹ para os sujeitos com TNCL, 1935 ± 409 pg mL⁻¹ para pacientes com DA leve, 2029 ± 495 pg mL⁻¹ para DA moderada e 2244 ± 376 pg mL⁻¹ para a DA avançada. Como pode-se observar na FIGURA 4.9, há um aumento da concentração de ADAM10 plasmática de sujeitos doentes em comparação com os controles

saudáveis e também com a progressão da doença, de acordo com os estágios da DA. Níveis do biomarcador nos indivíduos saudáveis e nos pacientes com TNCL e DA (nos diferentes estágios da doença) foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

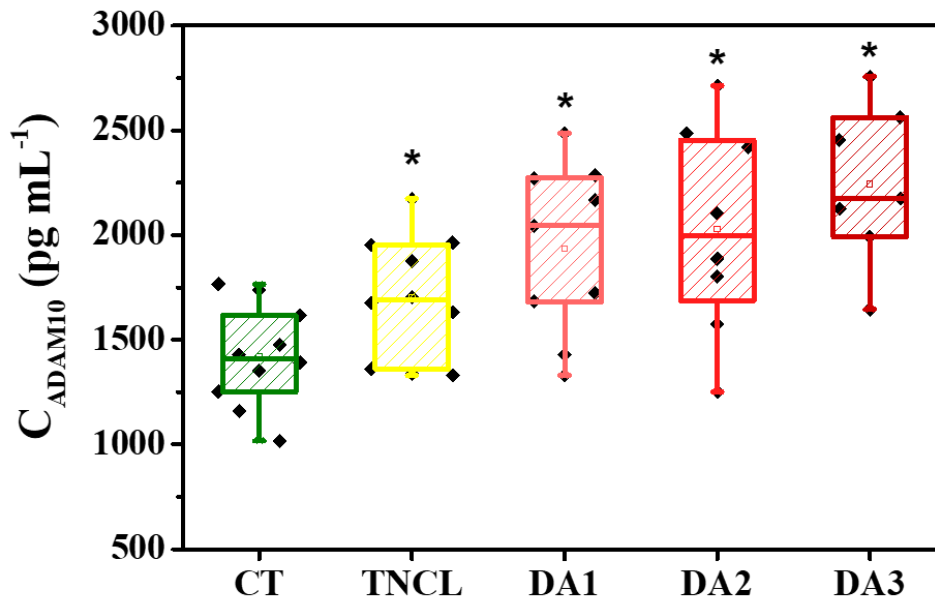


FIGURA 4.9 - Diagrama de caixas para os níveis de ADAM10 encontrados no plasma humano dos sujeitos CT, com TNCL, DA1, DA2 e DA3, * $p < 0,05$.

Os resultados obtidos para os níveis de ADAM10 no plasma dos pacientes foram também analisados utilizando a curva ROC. A AUC em torno de 0,5 sugere nenhuma discriminação (teste não consegue diferenciar pacientes com e sem a doença), valores entre 0,7 e 0,8 é considerado aceitável, de 0,8 a 0,9 é considerado bom, e AUC maior que 0,9 é considerada excelente¹³².

Curvas ROC para o biomarcador utilizando o dispositivo microfluídico e o ELISA são mostradas na FIGURA 4.10. A partir dos resultados obtidos com as mesmas amostras CT e DA pelo imunoenensaio microfluídico e ELISA, a AUC foi de 0,89 e 0,92, respectivamente. Esses valores de AUC são considerados excelentes¹³².

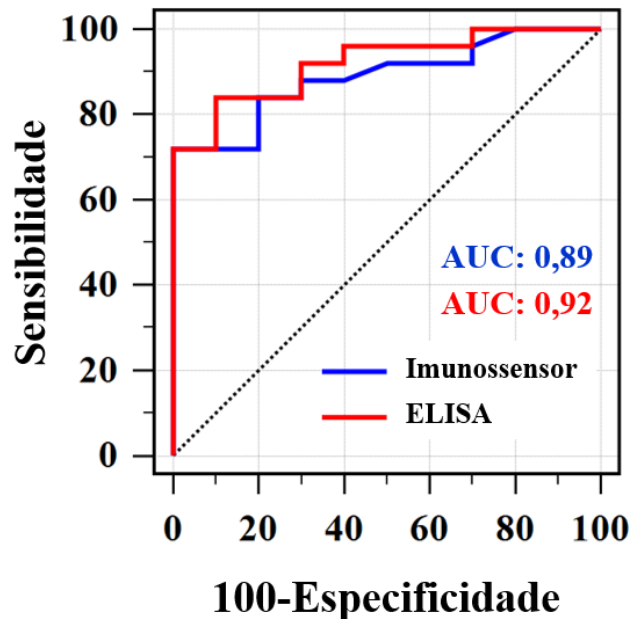


FIGURA 4.10 - Curvas ROC para detecção da ADAM10. Respostas para dos sujeitos controle *vs.* DA.

A análise das curvas ROC demonstrou que o imunoensaio microfluídico proposto alcançou 72% de sensibilidade e 100% de especificidade (ponto de corte $>1765 \text{ pg mL}^{-1}$), enquanto que o método ELISA apresentou 83% de sensibilidade e 90% de especificidade (ponto de corte $>1532 \text{ pg mL}^{-1}$).

A FIGURA 4.11 apresenta a curva ROC para o imunossensor e ELISA a partir dos dados dos CT *versus* os pacientes com TNCL e DA. O dispositivo desenvolvido permite diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes com TNCL ou DA com 62% de sensibilidade e 100% de especificidade (ponto de corte $>1765 \text{ pg mL}^{-1}$) e o ELISA com sensibilidade de 65% e especificidade de 100% (ponto de corte $>1665 \text{ pg mL}^{-1}$). A AUC para o imunossensor e ELISA foi de 0,85 e 0,90, respectivamente.

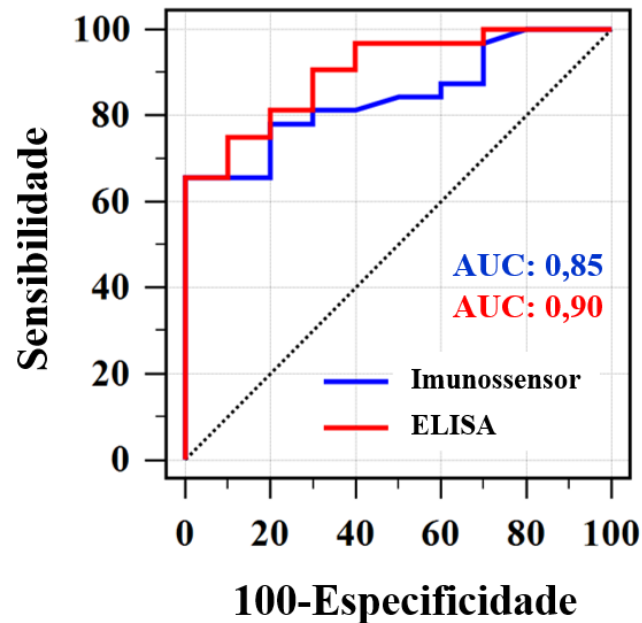


FIGURA 4.11 - Curvas ROC para detecção da ADAM10. Respostas de sujeitos controle *vs.* pacientes TNCL + DA.

Com a inclusão dos pacientes com TNCL no grupo de pacientes diagnósticos com DA, pode-se notar a diminuição da AUC, bem como a sensibilidade e especificidade para ambos os métodos (com exceção da especificidade para ELISA). Essa redução no desempenho já era esperado, uma vez que a concentração de ADAM10 nos pacientes com TNCL é menor que nos pacientes com DA, diminuindo levemente a precisão do método, já que fica mais difícil de diferenciar os doentes do grupo CT. Porém, ainda assim é possível diferenciar os grupos com excelente exatidão. Esses resultados demonstram que a detecção do biomarcador ADAM10 em amostra de plasma surge como uma alternativa viável para o diagnóstico precoce diferencial da DA.

A possibilidade do imunoenensaio desenvolvido permitir diferenciar níveis de ADAM10 dos sujeitos de cada grupo independente foi avaliada. Os dados obtidos com o dispositivo são apresentados como diagrama de pontos (FIGURA 4.12) e os dados do grupo CT *vs.* cada grupo de indivíduos diagnosticados (TNCL,

DA1, DA2 e DA3) são mostrados como pontos em dois eixos verticais. A linha horizontal indica o valor de corte, isto é, a concentração de ADAM10 plasmática que o dispositivo proposto consegue discriminar o grupo doente do grupo sadio com determinada especificidade e sensibilidade.

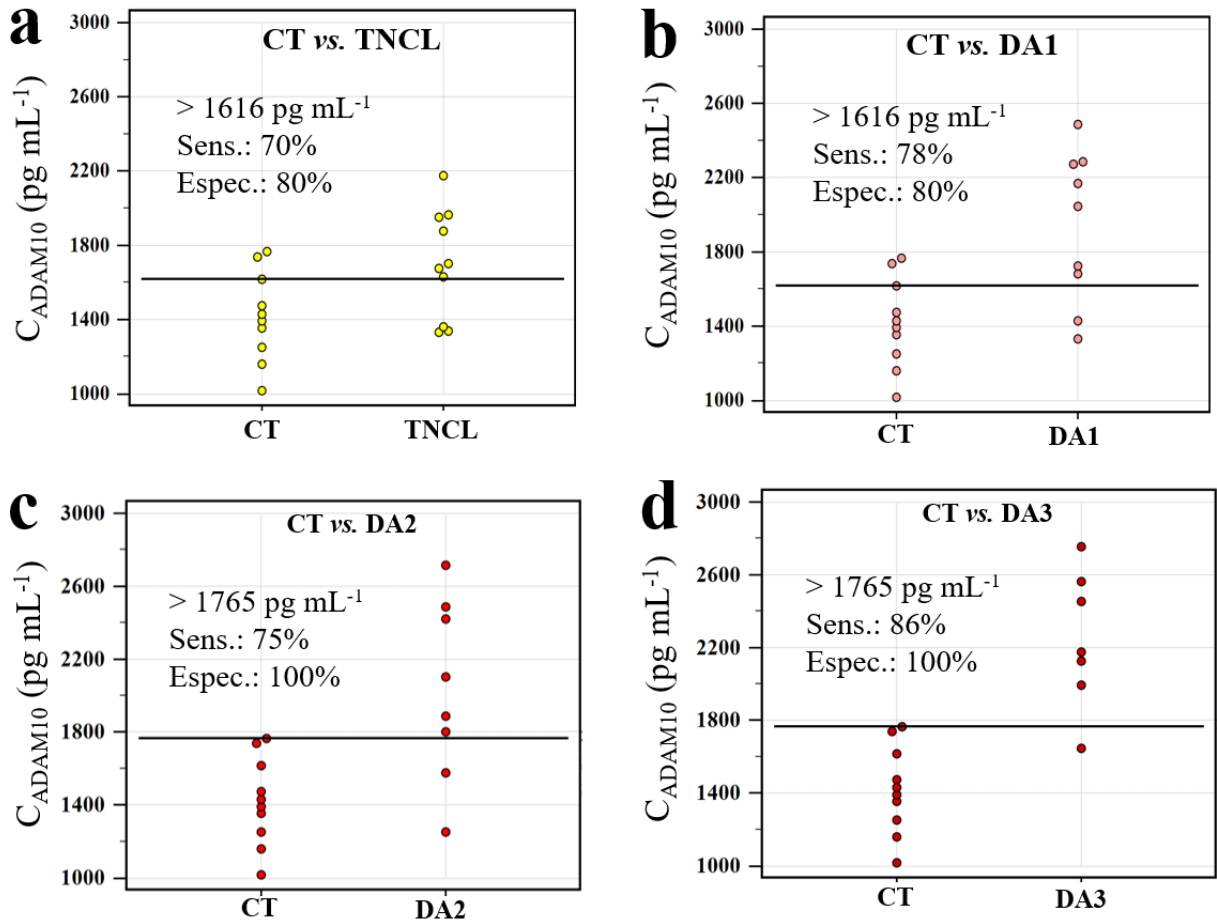


FIGURA 4.12 - Diagrama de pontos dos níveis do biomarcador ADAM10 comparando, independentemente, o grupo controle com os diferentes estágios: a) grupo CT vs. TNCL, teste t $p = 0,03$; b) CT vs. DA1, teste t $p = 0,001$; c) CT vs. DA2, teste t $p = 0,003$; d) CT vs. DA3, teste t $p < 0,0001$.

A FIGURA 4.12a mostra o diagrama de pontos para os níveis de ADAM10 no plasma do grupo CT e grupo com TNCL. O melhor valor de corte

obtido foi $>1616 \text{ pg mL}^{-1}$, com sensibilidade de 70% e especificidade de 80%. As FIGURAS 4.12b-d apresentam os diagramas de pontos para os CTs e pacientes com provável DA. Para DA1 (FIGURA 4.12b), o melhor valor de corte foi $>1616 \text{ pg mL}^{-1}$ com 78% de sensibilidade e 80% de especificidade. Nos resultados entre os sujeitos CT e DA2 (FIGURA 4.12c), o valor de corte foi $>1765 \text{ pg mL}^{-1}$ com sensibilidade de 75% e especificidade de 100% e para pacientes com DA3 (FIGURA 4.12d), um valor de corte de 1765 pg mL^{-1} com sensibilidade de 85% e especificidade de 100% foram obtidos. Todos os grupos foram estatisticamente diferentes.

Nota-se uma melhora da capacidade discriminatória do teste com o avanço da doença, ou seja, quanto mais avançado o estágio da DA, mais preciso é o diagnóstico. Como os níveis do biomarcador estão aumentados em pacientes doentes quando comparado com os saudáveis, fica mais fácil separá-los. Esses resultados indicam a capacidade do dispositivo em diferenciar os estágios da DA com boa precisão em todos os casos.

Com relação ao diagnóstico precoce, a distinção do TNCL seria uma forma de identificação preventiva de pessoas com maior risco de desenvolver a doença. O dispositivo apresentou AUC de 0,74 para a curva ROC do grupo CT vs. TNCL, o que é considerado aceitável para as condições clínicas reais e com diagnóstico padrão de referência válidos¹³⁶.

Os resultados indicaram a boa capacidade do imunoensaio desenvolvido em medir os níveis da proteína ADAM10 em amostras de sangue, bem como aplicá-lo no diagnóstico precoce da DA. Ainda, a proteína permitiu diferenciar os estágios da doença, o que a torna um potencial biomarcador para a DA, podendo ser aplicado também no monitoramento da doença. Levando em conta que os biomarcadores atualmente utilizados para o diagnóstico da doença encontram-se no liquor, o que implica em métodos extremamente invasivos, a ADAM10 mostra-se como uma excelente alternativa pouco invasiva para o diagnóstico da DA.

Ademais, o dispositivo apresentou excelentes vantagens frente ao método padrão ELISA, como curto tempo de análise, cerca de 70 min para o método proposto contra 4 h para o ELISA; o LD foi cerca de 5.000 vezes menor ($5,6 \text{ fg mL}^{-1}$ do imunossensor *vs.* 28 pg mL^{-1} para o ELISA), o que requer pequeno volume de amostra, sendo apenas $5 \text{ }\mu\text{L}$ de plasma suficiente para o ensaio; além disso, o dispositivo microfluídico apresentou baixo custo quando comparado ao método padrão, com simplicidade operacional e descartabilidade.

Recentemente, Sogorb-Esteve e colaboradores publicaram um trabalho no qual demonstram que os níveis de ADAM10 nas formas maduras (completas e truncadas), mas não as imaturas, estão diminuídas no liquor de pacientes com DA comparado ao controle¹³⁷. A fim de investigar esta informação, foi avaliado uma segunda coorte de indivíduos na qual comparou-se as concentrações de ADAM10 no liquor e soro dos mesmos pacientes. A FIGURA 4.13a mostra o gráfico de barras para os níveis do biomarcador para as duas amostras.

Analisando a FIGURA 4.13b, observa-se que os níveis de ADAM10 encontrados no liquor foram cerca de dez vezes menores que no soro. Em ambas amostras, nota-se um aumento da concentração de ADAM10 com o desenvolvimento da doença em comparação aos sujeitos controle. Embora os valores de ADAM10 no liquor não apresentarem diferença estatística significativa, um número limitado de amostras foi analisado, o que pode levar a interpretações inconclusivas. Apesar disso, os níveis de ADAM10 no soro são estatisticamente diferentes entre os grupos controle e doentes (TNCL + DA).

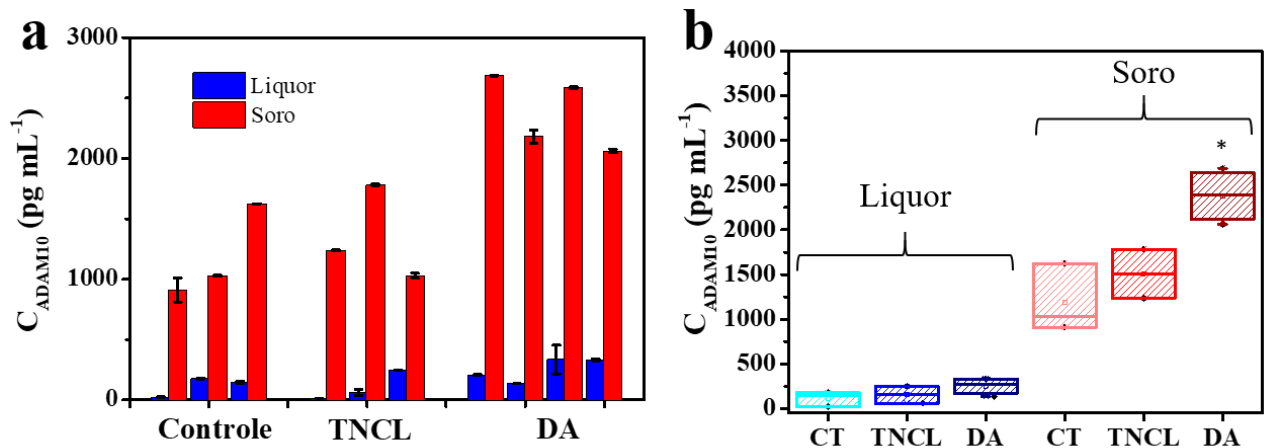


FIGURA 4.13 - a) Gráfico de barras com os níveis da proteína ADAM10 no liquor (barra azul) e soro (barras em vermelho) humano da coorte 2 usando o imunossensor proposto. b) Diagrama de caixas para os níveis de ADAM10 encontrados no soro e liquor dos sujeitos CT, com TNCL e DA da coorte 2. Uma tendência no aumento dos níveis de ADAM10 com a progressão da doença foi observada em amostras de liquor (teste t $p = 0,18$) e soro (teste t $p = 0,04$) dos mesmos pacientes ($n = 10$).

O aumento dos níveis de ADAM10 no liquor corrobora com os valores encontrados nos fluidos sanguíneos (para as duas coortes). Os resultados controversos deste trabalho com os encontrados por Sogorb-Esteve et al.¹³⁷ pode estar relacionado com os diferentes anticorpos usados em ambos os estudos. Além disso, níveis baixos de β A42 e altos de tTau e pTau no liquor das amostras com DA foram encontrados quando analisados pelo método Luminex[®], confirmando o diagnóstico¹³¹ (Tabela 3.2). Ainda, é importante ressaltar, que as formas solúveis da ADAM10 encontradas no sangue e no liquor terão comportamentos distintos em relação às formas ancoradas nas membranas de plaquetas e neurônios. Por esses motivos, supõe-se que os níveis aumentados de ADAM10 no liquor e soro correspondem às formas solúveis e inativas da ADAM10. Isso pode explicar os

resultados encontrados para níveis reduzidos de ADAM10 em plaquetas de pacientes com DA^{55,138}.

4.4 Determinação do biomarcador β A42

4.4.1 Constante de associação do anticorpo anti- β A42

Para a detecção do peptídeo β A42 foi necessário um imunoensaio competitivo, visto que o biomarcador é pequeno (42 aminoácidos com ~4,5 kDa), possuindo apenas uma epítipo para reconhecimento do anticorpo, então, não seria possível a quantificação via ensaio do tipo sanduíche. Entretanto, a sensibilidade do ensaio competitivo é limitada pela constante de afinidade do anticorpo utilizado, por isso, sua avaliação é importante para verificar sua aplicabilidade¹³⁹.

Neste trabalho foi proposto um método para avaliar a constante de associação (K_a) entre o anticorpo anti- β A42 e o biomarcador β A42 baseado no modelo da Isoterma de Langmuir^{140,141}, na qual avaliou-se a variação da corrente para o cálculo da K_a . A K_a pode ser facilmente obtida pela medida da corrente em diferentes concentrações de anticorpo após a incubação com uma superfície contendo uma concentração fixa de antígeno (β A42), conforme equação 2.

$$\frac{C}{I} = \frac{1}{K_a I_{max}} + \frac{C}{I_{max}} \quad (2)$$

onde I é a corrente no equilíbrio, C é a concentração de anticorpo, I_{max} é a corrente quando C é infinita e K_a é a constante de associação/ligação.

A FIGURA 4.14a mostra a variação da corrente obtida para cinco determinações independentes da interação β A42/anti- β A42 variando a concentração do anticorpo de 10 pg mL⁻¹ a 1 μ g mL⁻¹. A partir dos resultados do gráfico da FIGURA 4.13a, foi construído a isoterma de Langmuir para a interação antígeno-anticorpo (FIGURA 4.14b).

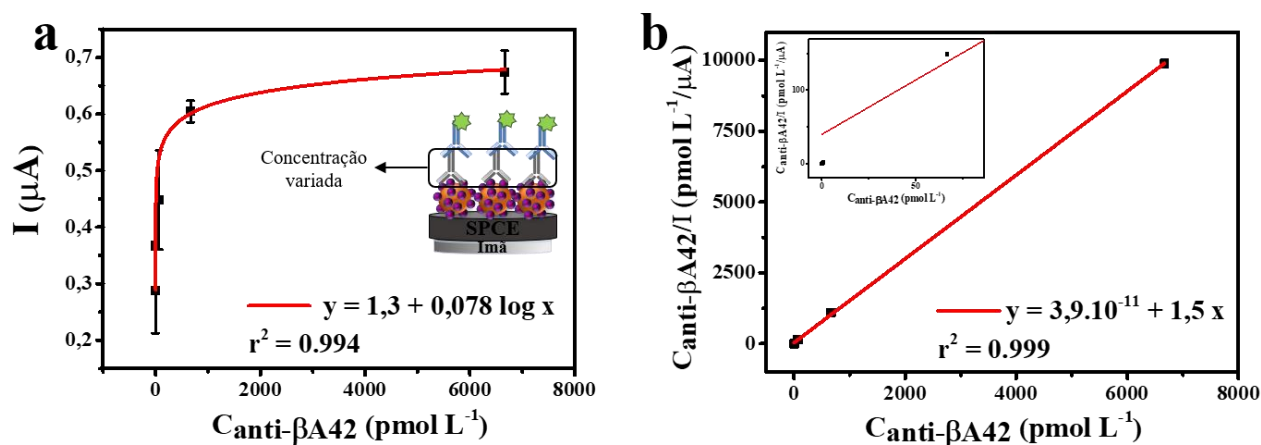


FIGURA 4.14 - a) Gráfico da variação da corrente monitorada após a interação de diferentes concentrações do anticorpo anti- βA42 com antígeno βA42 ($n \geq 5$). b) Isoterma de Langmuir linearizada para a interação anti- $\beta\text{A42}/\beta\text{A42}$ obtida para o cálculo da K_a utilizando a equação 2. Inserção: aproximação da curva para os primeiros pontos da isoterma.

Conforme a equação 2, é possível encontrar o valor da K_a para a interação entre anti- $\beta\text{A42}/\beta\text{A42}$ utilizando a razão entre o coeficiente angular e linear da isoterma de Langmuir (FIGURA 4.14b). A K_a calculada foi de $3,7 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}$. A afinidade do anticorpo pode ser demonstrada em termos da constante de dissociação (K_D). K_D e K_a são inversamente proporcionais, de modo que quanto menor o valor da K_D , maior será a afinidade do anticorpo por seu alvo^{142,143}. Neste caso, o valor de K_D obtido foi de $2,7 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$.

As constantes de dissociação para interação proteína-ligante pode ter várias ordens de magnitude (FIGURA 4.14), sendo que a ligação de mais alta afinidade relatada é entre a biotina-avidina, com $K_D = 1 \times 10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$ ¹⁴⁴.

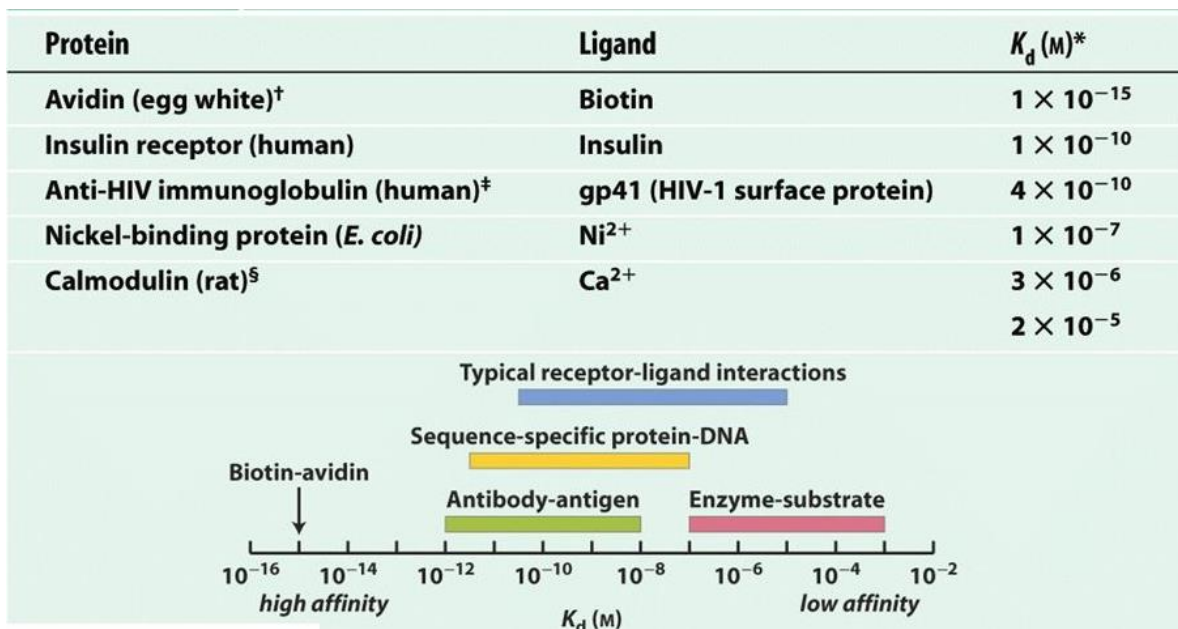


FIGURA 4.15 – Constantes de dissociação para diferentes proteínas-ligantes. Fonte: NELSON, D. L. & COX, M. M, 2008¹⁴⁴.

A maioria dos anticorpos possui valores da K_D na faixa de $\mu\text{mol L}^{-1}$ a nmol L^{-1} , sendo que anticorpos que possuem alta afinidade geralmente são considerados na faixa de nmol L^{-1} a pmol L^{-1} ^{144,145}, demonstrando que o anticorpo anti- βA42 possui afinidade elevada pelo alvo βA42 .

Ștefănescu e colaboradores determinaram a afinidade do anticorpo policlonal anti- βA42 interagindo com o peptídeo βA16 , e uma K_D na ordem de nanomolar foi encontrada¹⁴⁶. Apesar dos pesquisadores analisarem a interação do anticorpo anti- βA42 com outro alvo, o estudo fornece uma ideia, em termos de comparação, da alta afinidade do par antígeno/anticorpo utilizado neste trabalho.

4.4.2 Avaliação dos imunoenaios para quantificação da $\beta A42$

Várias estratégias para detecção do peptídeo $\beta A42$ foram utilizadas a fim de encontrar uma faixa de trabalho suficientemente sensível para ser aplicado em amostras reais. Diferentes tipos de imunoenaios foram testados utilizando $\beta A42$ e os resultados estão apresentados adiante.

4.2.2.1 Imunoensaio competitivo direto

Iniciaram-se os estudos por meio do imunoensaio competitivo direto, uma vez que esse ensaio envolve apenas uma etapa de incubação com o marcador, reduzindo o tempo de análise. Duas estratégias de desenvolvimento do imunossensor foram estudadas. A primeira imobilizando o peptídeo no eletrodo e incubando o analito com as PMs modificadas com anticorpo e enzima (FIGURA 4.16a). Na segunda, imobilizou-se o anticorpo sobre o eletrodo e as imunorreações competitivas foram por meio das PMs decoradas com enzima e peptídeo e o analito “livre” em solução (FIGURA 4.16b).

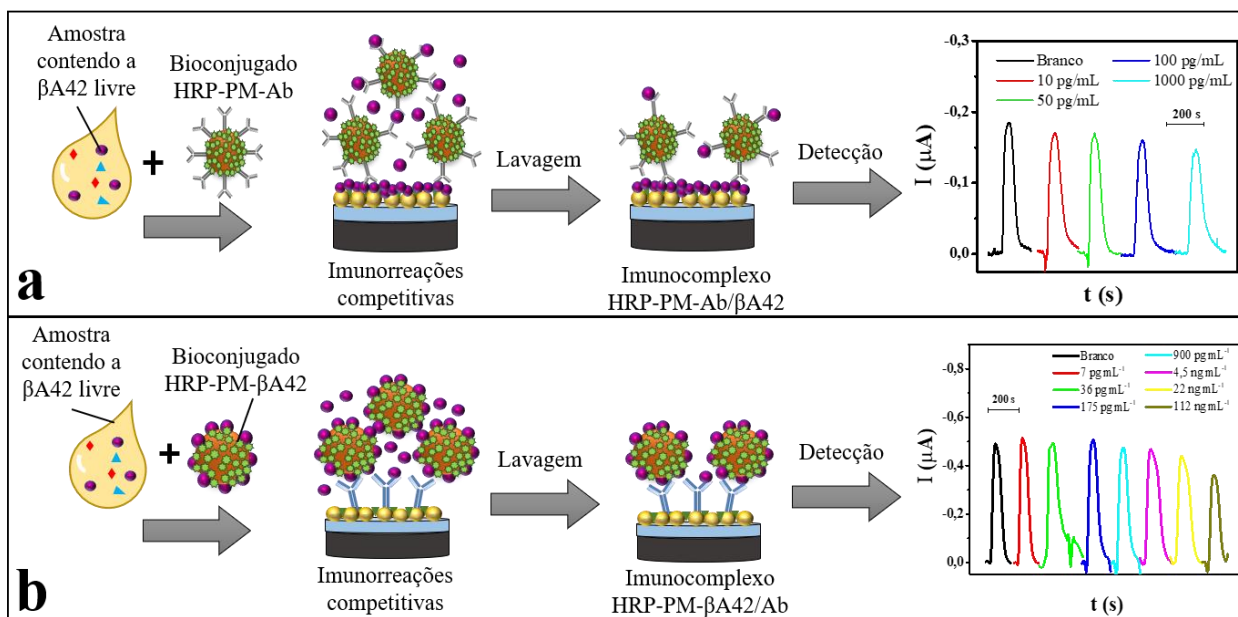


FIGURA 4.16 - Ilustração do imunoensaio competitivo direto para a detecção da β A42: a) estratégia de detecção baseada na modificação dos eletrodos com o peptídeo β A42 e incubação de uma solução contendo o peptídeo β A42 livre e as PMs conjugadas com o anticorpo e marcador eletroquímico e b) estratégia de detecção baseada na modificação dos eletrodos com anticorpos anti- β A42 e incubação do peptídeo β A42 livre e conjugado nas PMs com o marcador eletroquímico.

Na FIGURA 4.16a, os resultados para a detecção de concentrações de β A42 livre na faixa de 0 a 1000 pg mL^{-1} são apresentadas. Observa-se que houve uma pequena competição entre a β A42 imobilizada e 1000 pg mL^{-1} de β A42 livre, inibindo cerca de 20% do sinal em relação ao branco (amperograma). No entanto, para as concentrações do biomarcador entre 10 e 100 pg mL^{-1} , o sinal se manteve praticamente constante. A diferença significativa só é notada em concentrações superiores a 1000 pg mL^{-1} . Isso pode ter ocorrido devido ao grande número de anticorpos imobilizados na superfície das PMs, e, conseqüentemente, um grande número de sítios de ligação disponíveis, fazendo com que o anticorpo não fosse o

reagente limitante da reação⁶⁸, por isso, a competição só começou a ocorrer em concentrações mais elevadas de β A42.

Uma alternativa para alcançar maior sensibilidade analítica na análise no biomarcador foi testada invertendo a imobilização do antígeno e anticorpo. O anticorpo anti- β A42 foi conjugado no eletrodo e a β A42 nas PMs (FIGURA 4.16b). Respostas das correntes transientes para uma faixa de concentração de 0 a 112 ng mL⁻¹ de β A42 foram obtidas. Nota-se uma diminuição da corrente de pico com uma tendência logarítmica em concentrações na ordem de ng mL⁻¹. Para as concentrações inferiores, nenhuma variação do sinal analítico foi observada, indicando que não houve competição entre os analitos. Esse efeito pode estar relacionado com o tamanho das PMs utilizadas neste estudo. Como elas são demasiadamente grandes (1 μ m) comparadas ao peptídeo, pode ocorrer um impedimento estérico de forma que a competição só aconteça em concentrações mais elevadas.

Pesquisas na área de neurologia demonstram níveis de β A42 no sangue de pacientes com DA próximos a 10 pg mL⁻¹ ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Nesse sentido, faz-se necessário um método suficientemente sensível para que a β A42 possa ser determinada no plasma humano, e as estratégias avaliadas não alcançaram esse limite de quantificação. Desta forma, optou-se por estudar o imunoenensaio baseado na competição indireta.

4.2.2.2 Imunoensaio competitivo indireto

O ensaio competitivo indireto foi realizado utilizando duas estratégias, sendo em uma o anticorpo secundário conjugado nas PMs marcadas com HRP (IgG-PM-HRP) e na outra o anticorpo secundário comercial já marcado com a enzima (IgG-HRP).

Para o ensaio com as PMs, imobilizou-se o peptídeo β A42 no eletrodo e variou-se a concentração de β A42 livre durante a competição numa faixa de 0 a 236,8 pg mL^{-1} . As respostas de corrente transientes para diferentes concentrações de β A42 e a respectiva curva analítica estão apresentados na FIGURA 4.17.

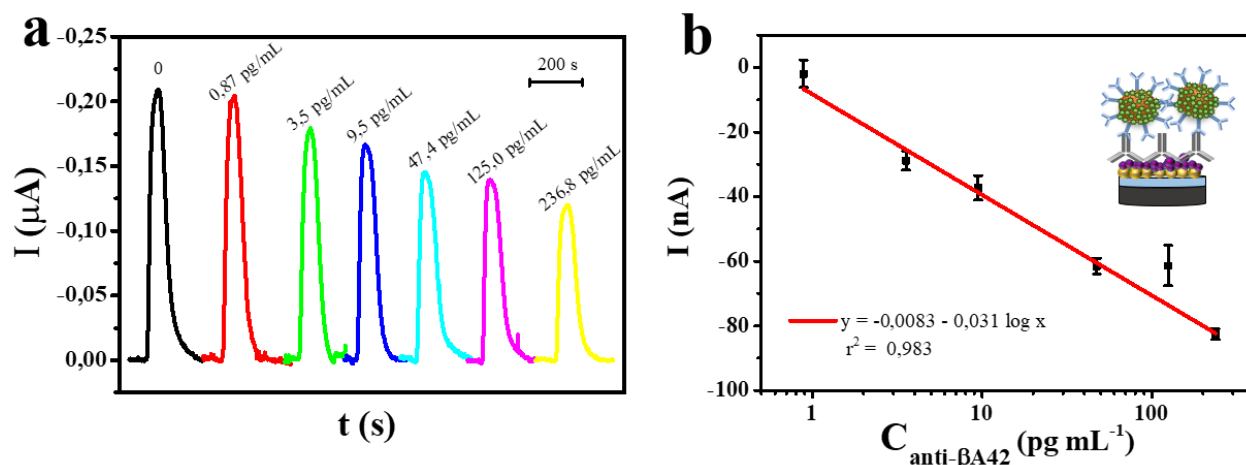


FIGURA 4.17 - a) Respostas transientes de corrente para o branco e diferentes concentrações de β A42. Imunoensaio competitivo indireto com as PMs conjugadas com os anticorpos de detecção e enzimas HRP. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, potencial de $-0,25 \text{ V}$ e solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. b) Curva analítica para o biomarcador β A42 ($n \geq 5$).

Observa-se, na FIGURA 4.17a, uma inibição do sinal analítico inversamente proporcional ao branco num intervalo de concentração de β A42 de 0,87 a 236,8 pg mL^{-1} . Esse comportamento indica que o imunoensaio competitivo indireto é mais sensível para detectar o peptídeo do que o competitivo direto.

A curva analítica obtida está apresentada na FIGURA 4.17b, na qual o valor do branco já está devidamente subtraído. As correntes de pico decresceram linearmente com o logaritmo da concentração de β A42 e a equação da reta referente a curva analítica foi igual a $I (\mu\text{A}) = -0,0083 (\pm 0,0033) - 0,031 (\pm 0,002) \times \log [\beta\text{A42}]$

(pg mL^{-1}), com coeficiente de correlação linear (r^2) igual a 0,983 e sensibilidade analítica de $0,031 \mu\text{A mL pg}^{-1} \log [\beta\text{A42}]$. A boa precisão intra-dispositivo pode ser observada pelas pequenas barras de erro em cada concentração de curva analítica. O LD foi considerado como sendo o primeiro ponto da curva analítica, sendo este de $0,87 \text{ pg mL}^{-1}$.

Avaliou-se também a resposta do imunossensor para o anticorpo IgG-HRP como anticorpo de detecção. As mesmas condições do ensaio anterior foram adotadas, substituindo as PMs pelo anticorpo secundário marcado. As respostas de correntes transientes para diferentes concentrações de βA42 e a respectiva curva analítica estão apresentados na FIGURA 4.18.

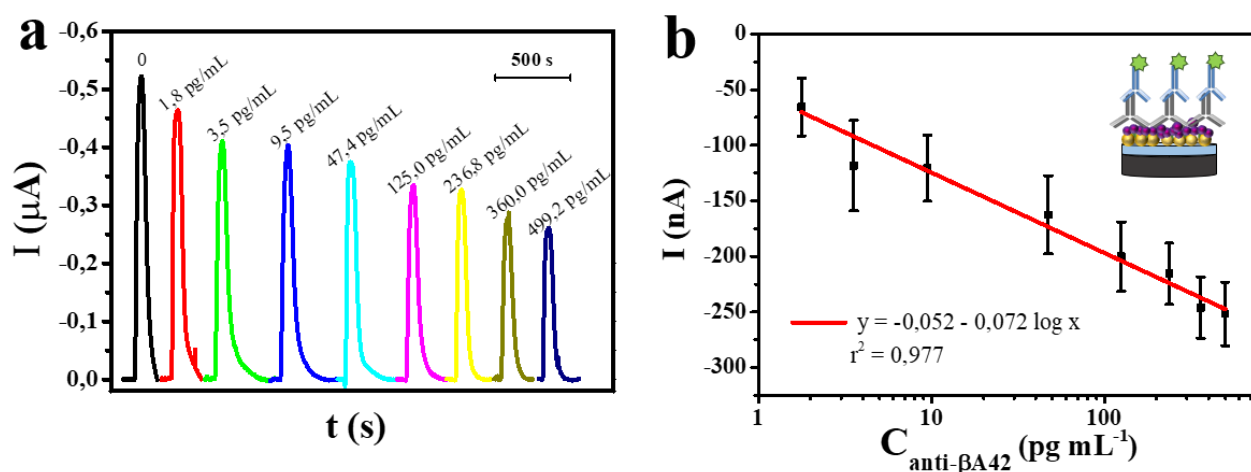


FIGURA 4.18 - a) Respostas transientes de corrente para o branco e diferentes concentrações de βA42 . Imunoensaio competitivo indireto com anticorpo de detecção conjugado com a enzima HRP. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, potencial de $-0,25 \text{ V}$ e solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. b) Curva analítica para o biomarcador βA42 ($n \geq 5$).

Na FIGURA 4.18a nota-se uma competição do anticorpo pelos biomarcadores livres e imobilizados numa faixa de concentração de 1,8 a 499,2 pg mL^{-1} .

mL^{-1} . A curva analítica obtida está apresentada na FIGURA 4.18b, na qual o valor do branco já está devidamente subtraído. As correntes de pico decresceram linearmente com o logaritmo da concentração de βA42 e a equação da reta obtida foi $I (\mu\text{A}) = -0,052 (\pm 0,008) - 0,072 (\pm 0,004) \times \log [\beta\text{A42}] (\text{pg mL}^{-1})$, com coeficiente de correlação linear (r^2) igual a 0,977 e sensibilidade analítica de $0,072 \mu\text{A mL pg}^{-1} \log [\beta\text{A42}]$. O LD foi considerado como sendo o primeiro ponto da curva analítica, sendo este de $1,8 \text{ pg mL}^{-1}$.

O uso do IgG-HRP como anticorpo de detecção ganha em sensibilidade analítica quando comparado com o imunossensor com as PMs bioconjugadas, conforme pode ser observado na FIGURA 4.19.

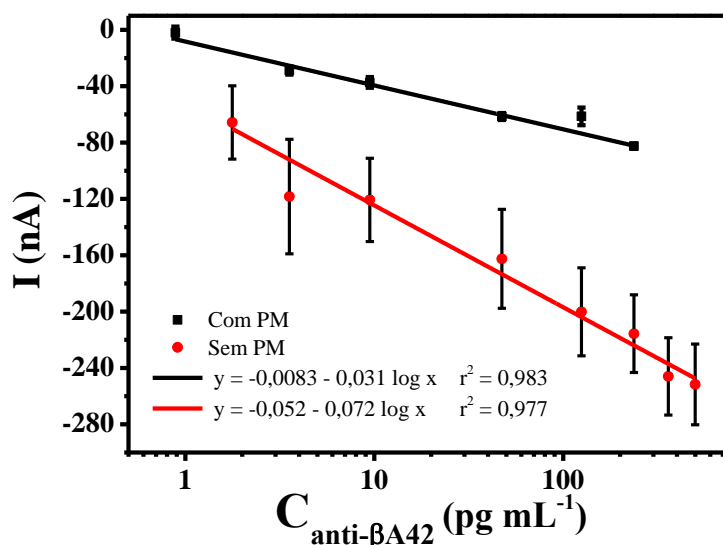


FIGURA 4.19 – Comparação da sensibilidade analítica dos ensaios competitivo indireto para a detecção do biomarcador βA42 usando na detecção a IgG-PM-HRP (— com PM) e IgG-HRP (— sem PM).

Esse resultado pode estar relacionado com o impedimento estérico devido ao elevado tamanho das PMs, fazendo com que o bioconjugado se oriente de tal modo que não se ligue ao anticorpo na superfície do transdutor^{150,151}. Assim,

pouco varia a quantidade de IgG-PMs-HRP na superfície do eletrodo e uma menor diferença do sinal pode ser observada. Entretanto, quando comparado a precisão intra-dispositivo, observa-se que os desvios padrão com o uso do IgG-HRP são maiores que quando utilizado a IgG-PM-HRP, demonstrando que o uso das PMs colabora para uma boa repetibilidade do imunossensor^{84,85,95,152}.

Nota-se que a faixa de trabalho para o ensaio competitivo não é tão ampla como um do tipo sanduíche (ver curva analítica para o biomarcador ADAM10), possuindo um intervalo de trabalho com concentrações mais elevadas e estreita, característico para esse tipo de imunoensaio⁷².

Contudo, o imunoensaio competitivo indireto utilizando o IgG-HRP como anticorpo de detecção foi escolhido para prosseguir os estudos de quantificação da β A42 nas amostras reais, uma vez que demonstrou maior sensibilidade analítica para a determinação do biomarcador.

4.4.3 Determinação da β A42 em amostras de soro e liquor

Amostras de soro e liquor da coorte 2 foram estudadas, sendo elas 8 controles saudáveis, 7 com TNCL e 9 de pacientes com DA. Amostras de soro foram analisadas sem prévia diluição, uma vez que os valores encontrados na literatura para a β A42 em amostras de sangue¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ estavam dentro do intervalo linear do método.

O ensaio competitivo indireto na determinação da β A42 em amostras de soro foi aplicado e o resultado das correntes transientes resultantes estão apresentados na FIGURA 4.20.

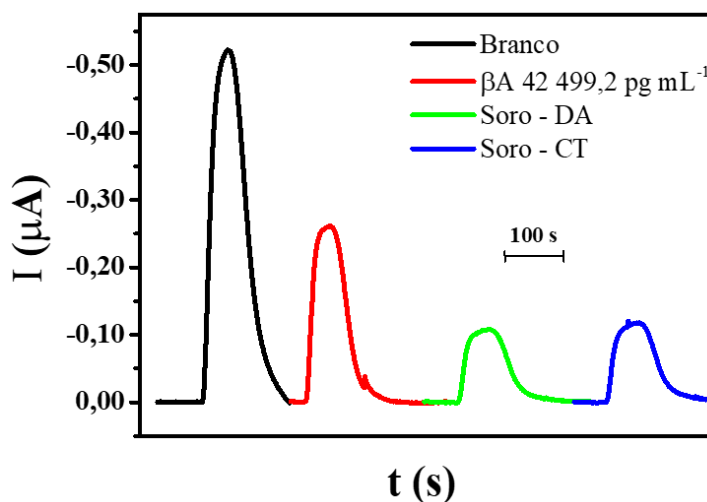


FIGURA 4.20 - Respostas transientes de corrente para o branco, padrão β A42 e amostras de paciente com DA e CT. Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, potencial de $-0,25 \text{ V}$ e solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Observa-se que as correntes de pico referente as amostras foram inferiores a maior concentração do padrão do biomarcador, ficando fora da faixa linear da curva analítica. Para investigar esse ocorrido, fez-se uma voltametria cíclica das amostras/padrão/branco, nas mesmas condições de ensaio, a fim de avaliar o perfil voltamétrico de cada solução.

Os voltamogramas cíclicos referente a cada medida estão demonstrados na FIGURA 4.21. Na FIGURA 4.21a, tem-se os voltamogramas cíclicos para as amostras de liquor e soro de pacientes com DA e das soluções do branco e padrão β A42. Observa-se que o perfil voltamétrico para a amostra de soro (linha vermelha) possui um comportamento diferente das outras respostas, apresentando um pico de redução em aproximadamente $-0,1 \text{ V}$, com um leve ombro no potencial referente a redução da benzoquinona ($-0,25 \text{ V}$). Esse comportamento pode estar relacionado ao efeito de matriz, uma vez que o soro é uma amostra bastante complexa e não foi previamente diluída, sugerindo um bloqueio na superfície do eletrodo e,

consequentemente, o não reconhecimento do anticorpo de detecção. Além disso, outras espécies podem ter sido adsorvidas na superfície do eletrodo durante a incubação da amostra, levando ao aparecimento de um novo pico catódico durante a varredura. Esse efeito foi observado em diferentes amostras de soro, tanto para as amostras de pacientes com DA quanto para os CT (FIGURA 4.21b). Isso explica as menores correntes de pico obtidas nas medidas amperométricas das amostras reais em comparação ao branco e o padrão do peptídeo.

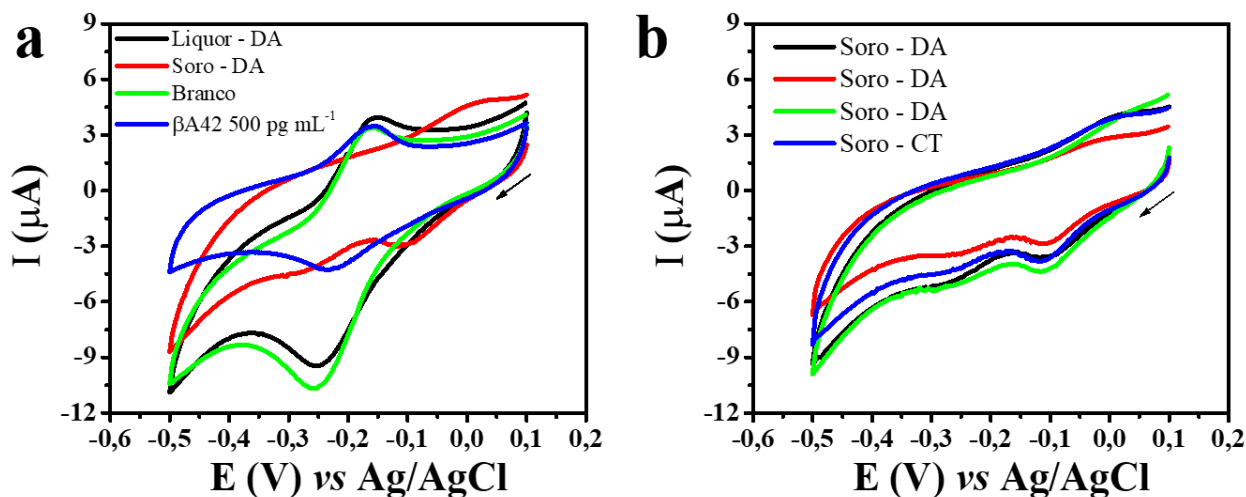


FIGURA 4.21 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a) branco, padrão β A42 e amostras de paciente com DA e CT e b) diferentes amostras de paciente com DA e CT, injetando uma solução mista de H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Parâmetros da VC: $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Pérez-Grijalba et al. já haviam demonstrado o efeito de matriz em amostras de plasma para quantificação dos peptídeos β A40 e β A42, no qual foi possível verificar que a detecção é prejudicada em amostras não diluídas quando comparado ao plasma diluído¹⁵³. Observa-se que para a amostra de liquor (linha preta, FIGURA 4.21a), há uma corrente de pico para a redução da benzoquinona bem definida e no mesmo potencial de redução das medidas do branco e do padrão.

Apesar do liquor ser uma amostra menos complexa que o sangue¹⁵⁴, ele também foi previamente diluído para os ensaios, o que pode ter colaborado para o sucesso do imunoenensaio competitivo.

Como não foi possível obter sinais analíticos quantificáveis para as amostras de soro humano, prosseguiu-se os estudos de detecção do biomarcador β A42 apenas nas amostras de liquor.

Amostras de liquor da coorte 2 foram diluídas 10 vezes em tampão PBS pH 7,4 para trazer as concentrações do peptídeo na faixa sensível do imunossensor. A validação da precisão analítica foi realizada por comparação dos resultados do imunossensor com a plataforma Luminex[®]. Os níveis de β A42 encontrados pelos dois métodos estão apresentadas em conjunto para cada amostra na FIGURA 4.22.

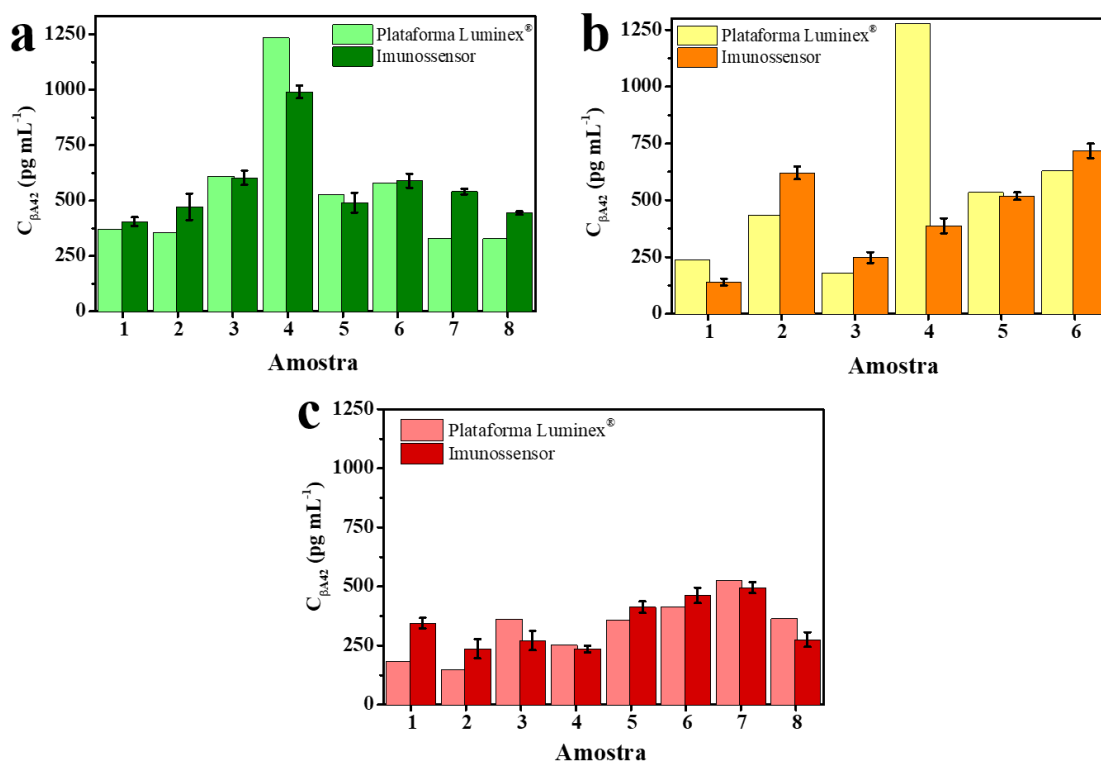


FIGURA 4.22 - Gráficos de barra para níveis do biomarcador β A42 em amostra de liquor humano analisados utilizando o imunoenensaio proposto e uma plataforma Luminex[®]. Resultados dos grupos a) controle, b) com TNCL e c) com DA.

Ambas metodologias apresentaram concentrações similares do biomarcador para a maioria dos sujeitos avaliados, com algumas flutuações entre os níveis de β A42 para algumas amostras. O teste t ($p = 0,22$) confirmou que não há diferença significativa entre a média dos dois métodos.

Observa-se, na FIGURA 4.23, que há uma diminuição da concentração de β A42 em liquor de sujeitos doentes em comparação com os controles saudáveis. Para os resultados obtidos com o imunossensor, entre o grupo CT e TNCL não há diferença estatística entre as médias da concentração do biomarcador (teste t $p = 0,26$). Já os níveis de β A42 no liquor de sujeitos saudáveis comparado aos com DA são estatisticamente diferentes (teste t $p = 0,0094$).

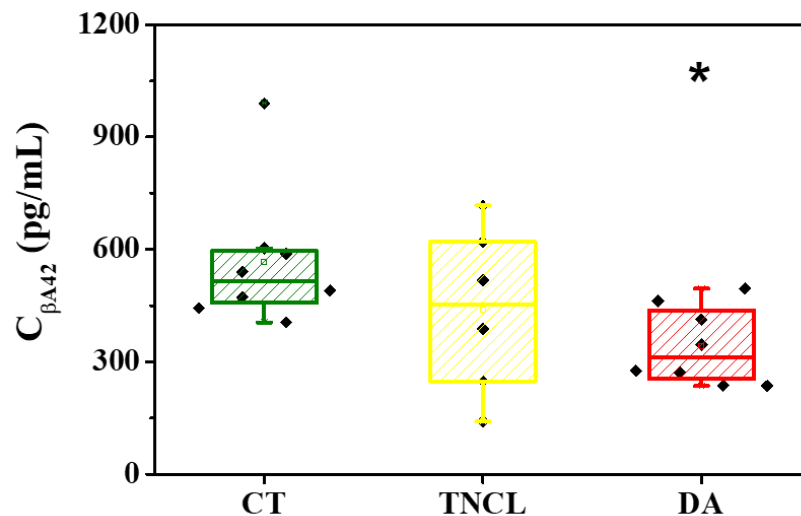


FIGURA 4.23 - Diagrama de caixas para os níveis de β A42 encontrados no liquor humano dos sujeitos CT, com TNCL e DA, * $p = 0,0094$.

Para avaliar a precisão do diagnóstico, os dados dos níveis de β A42 obtidos foram analisados utilizando a curva ROC para o dispositivo microfluídico e o método comparativo, FIGURA 4.24. O grupo TNCL foi incluído no grupo doente (doente = TNCL + DA).

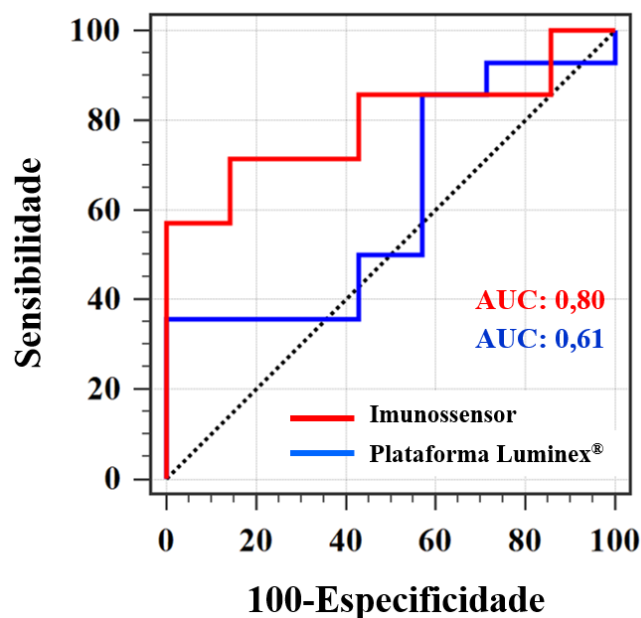


FIGURA 4.24 - Curvas ROC para detecção do biomarcador β A42. Respostas de sujeitos controle vs. pacientes TNCL + DA.

A partir dos resultados obtidos com as mesmas amostras dos pacientes CT e doentes, a AUC foi de 0,80 e 0,61 para o imunoensaio proposto e método comparativo, respectivamente. O valor de AUC para o dispositivo é considerado aceitável¹³², com boa capacidade em discriminar o grupo controle do doente. Já o método Luminex®, a AUC sugere que o teste de diagnóstico não tem capacidade discriminatória¹³².

Apesar das vantagens do uso da β A42 como biomarcador DA para auxiliar no diagnóstico da doença, ainda existem alguns desafios na sua implantação, como o estabelecimento de valores ótimos de corte. Diferentes valores são encontrados na literatura^{131,155,156}, isso é, em parte, devido à variabilidade dos valores de A β 42 obtidos em laboratórios clínicos com diferentes métodos¹⁵⁷, além da heterogeneidade da população mundial.

Avaliou-se a precisão do método em diferenciar os sujeitos saudáveis dos doentes seguindo o valor de corte encontrado por Forlenza e colaboradores¹³¹. Os pesquisadores avaliaram amostras de liquor de uma coorte brasileira e o valor de corte da β A42 que melhor discriminou os grupos foi $< 416 \text{ pg mL}^{-1}$.

A FIGURA 4.25 apresenta o diagrama de pontos para os níveis de β A42 no liquor dos grupos CT e doentes. Para o valor de corte $< 416 \text{ pg mL}^{-1}$, o dispositivo distingue os grupos com 64% de sensibilidade e 88% de especificidade.

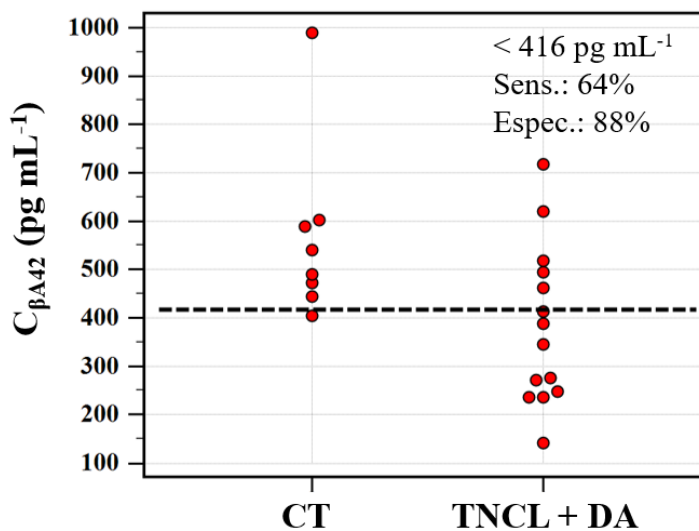


FIGURA 4.25 - Diagrama de pontos dos níveis do biomarcador β A42 para o grupo controle vs. doentes, teste t $p = 0,0061$.

A sensibilidade do diagnóstico pode ter sido limitada devido ao número de amostras relativamente pequeno em comparação com aqueles usados em estudos multicêntricos em grande escala. Ainda assim, o teste apresentou uma boa especificidade em identificar os falsos positivos.

Os resultados obtidos para a detecção da β A42 com o dispositivo proposto foram comparados com alguns trabalhos mais recentes encontrados na literatura utilizando imunossensores eletroquímicos, conforme a TABELA 4.1.

TABELA 4.1 - Imunossensores eletroquímicos para detecção de A β 42

Título	Deteccção	LD (pg mL⁻¹)	Amostra	Referência
Competitive electrochemical immunosensor for amyloid-beta 1-42 detection based on gold nanostructured Screen-Printed Carbon Electrodes	Voltametria de onde quadrada	100	Não aplicado	99
Competitive electrochemical immunoassay for detection of β -amyloid (1-42) and total β -amyloid peptides using p-aminophenol redox cycling	Amperometria	22,6*	Liquor artificial	100
Gelsolin bound β -amyloid peptides(1-40/1-42): Electrochemical evaluation of levels of soluble peptide associated with Alzheimer's disease	Voltametria de pulso diferencial	126*	Liquor e tecidos cerebrais de ratos	101
Alzheimer's disease: Development of a sensitive label-free electrochemical immunosensor for detection of amyloid beta peptide	Voltametria de onde quadrada	5,2	Não aplicado	102
Alzheimer's disease biomarkers detection in human samples by efficient capturing through porous magnetic microspheres and labelling with electrocatalytic gold nanoparticles	Cronoamperometria	19	Liquor (Plasma e Soro < LD)	103

Modified screen-printed electrode for development of a highly sensitive label-free impedimetric immunosensor to detect amyloid beta peptides	Espectroscopia de impedância eletroquímica	$2.6 \times 10^3^*$	Não aplicado	105
Electrochemical impedance spectroscopy analysis of A-beta (1-42) peptide using a nanostructured biochip	Espectroscopia de impedância eletroquímica	1	Não aplicado	106
Redox probe-free readings of a β -amyloid-42 plastic antibody sensory material assembled on copper@carbon nanotubes	Voltametria de onde quadrada	0,4	Soro artificial	158
An ultrasensitive electrochemical aptasensor for early diagnosis of Alzheimer's disease, using a fern leaves-like gold nanostructure	Voltametria de pulso diferencial	0,4	Liquor e soro fortificados	159
Este trabalho	Amperometria	0,87	Liquor de pacientes com DA e saudáveis	

*Valores foram expressos em pM e convertidos para pg mL^{-1} .

Conforme pode ser observado na TABELA 4.1, muitos dos trabalhos descritos na literatura não aplicaram os imunossensores em algum tipo de amostra. Alguns deles determinaram o peptídeo em amostras fortificadas ou de animais, sendo que apenas De La Escosura-Muñiz et al.¹⁰³ quantificaram a β A42 em liquor de paciente doente. Entretanto, não foi encontrado, até o presente momento, nenhum imunossensor eletroquímico aplicado na detecção do biomarcador para um número significativo de amostras, de modo a verificar a real precisão do dispositivo em detectar a DA e/ou diferenciar pacientes doentes dos saudáveis. Desta maneira, esse é o primeiro dispositivo eletroquímico utilizado para diagnóstico da DA por meio de estudos dos níveis da β A42 em liquor de sujeitos saudáveis e doentes.

Desta maneira, os resultados demonstram a capacidade do dispositivo ser aplicado na análise da DA, tanto no diagnóstico precoce como na avaliação da evolução (ou não) da doença ou na resposta a um tratamento. O estudo com dois biomarcadores pode aumentar ainda mais a precisão do diagnóstico da DA, fornecendo uma simples e nova direção nos estudos com plataformas descartáveis de baixo custo.

5 CONCLUSÃO

Um dispositivo microfluídico totalmente descartável e de baixo custo foi desenvolvido para detecção dos biomarcadores da DA em amostra de plasma e liquor humano. A determinação da ADAM10 como biomarcador da DA utilizando um imunossensor eletroquímico foi descrito pela primeira vez na literatura. O limite de detecção obtido com o imunoensaio proposto ($5,6 \text{ fg mL}^{-1}$) foi cerca de cinco mil vezes menor ao obtido com kit ELISA comercial (28 pg mL^{-1} informado pelo fabricante) utilizado como método comparativo. A capacidade de detecção de concentrações muito baixas do biomarcador em amostra de plasma sanguíneo oferece ao paciente um recurso minimamente invasivo devido ao baixo volume de amostra necessário para fazer a medida. Como a amostra pode ser significativamente diluída, contribui ainda para a eliminação de possíveis interferentes.

Atualmente, os biomarcadores clássicos para o diagnóstico da DA são medidos em amostra de liquor do paciente. Para um diagnóstico de rotina, esse procedimento é inviável, pois requer a punção lombar que é um procedimento altamente invasivo. Como não há biomarcadores sanguíneos para o diagnóstico da DA, a utilização da ADAM10 como possível novo biomarcador torna-se extremamente interessante.

O baixo custo de construção do imunossensor também foi um atrativo. Cada dispositivo tem um custo em material de aproximadamente R\$ 26,00. Como cada dispositivo contém 8 eletrodos, cada medida teria um custo médio de ~R\$ 3,30, enquanto que um kit ELISA comercial tem custo de aproximadamente R\$ 41,00 reais por medida. Assim, a facilidade de fabricação aliado ao baixo custo tornam o dispositivo viável, podendo vir a ser utilizado em larga escala o que pode levar a uma redução significativo dos custos de produção.

Os níveis de ADAM10 obtidos apresentaram valores significativamente aumentados no plasma de pacientes com TNCL e AD em comparação com os indivíduos cognitivamente saudáveis, tornando essa proteína um potencial biomarcador para a DA. O imunoenensaio proposto possibilitou ainda o diagnóstico precoce da DA, permitindo diferenciar as concentrações da ADAM10 em pacientes com TNCL dos controles saudáveis, além de distinguir os diferentes estágios da DA com ótima precisão.

Embora um número limitado de amostras terem sido avaliadas, esse estudo forneceu um método alternativo para avaliar o diagnóstico e monitoramento da DA. Novos estudos devem ser realizados com maior número de pacientes e incluir outros tipos de demência, a fim de avaliar se os níveis plasmáticos de ADAM10 também estariam alterados ou se essas alterações seriam específicas para demência devido à DA.

Para o biomarcador β A42, foi possível calcular K_a e K_D para o par antígeno-anticorpo, que forneceu uma ideia da sensibilidade do imunoenensaio, demonstrando que o anticorpo anti- β A42 possui alta afinidade pelo alvo β A42.

Após estudar diferentes estratégias para o ensaio competitivo na detecção da β A42, concluiu-se que o método competitivo indireto utilizando o anticorpo secundário conjugado com a enzima HRP demonstrou melhor desempenho e sensibilidade analítica na determinação do peptídeo, sendo então escolhido para a quantificação em amostras reais.

Apesar da aplicabilidade do imunossensor para detectar a β A42 no soro ter sido prejudicada devido ao efeito de matriz, foi possível quantificar seus níveis no liquor dos pacientes. As concentrações encontradas foram estatisticamente diferentes entre o grupo controle e doentes, com boa especificidade entre as amostras.

Ambos imunossensores apresentaram resultados semelhantes aos respectivos métodos comparativos, demonstrando boa concordância entre os valores obtidos, sem diferença significativa entre eles.

E por fim, a associação dos biomarcadores, principalmente a ADAM10, com o dispositivo microfluídico pode ser uma ferramenta confiável para auxiliar no diagnóstico precoce e monitoramento da DA, trazendo novas alternativas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

6 REFERÊNCIAS

1. GAVRILOV, L. A.; HEUVELINE, P. "Aging of Population". IN: The Encyclopedia of Population. Paul Demeny and Geoffrey McNicoll (Eds.) New York, Macmillan Reference USA, 2003.
2. UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Prospects: The 2017 Revision. New York, 2017.
3. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). "Projeção da população do Brasil e Unidades da Federação por sexo e idade para o período 2010-2060", 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9109-projecao-da-populacao.html?=&t=resultados>.
4. BLOOM, D. E.; LUCA, D. L. *The Global Demography of Aging: Facts, Explanations, Future*. IZA DP No. 10163, Bonn, 2016.
5. JIANG, T.; YU, J.-T.; TIAN, Y. & TAN, L. "Epidemiology and etiology of Alzheimer's disease: from genetic to non-genetic factors.". *Curr. Alzheimer Res.* **10**: 852, 2013.
6. PRINCE, M.; BRYCE, R.; ALBANESE, E.; WIMO, A.; RIBEIRO, W. & FERRI, C. P. "The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis". *Alzheimer's Dement.* **9**: 63, 2013.
7. WORLD ALZHEIMER REPORT 2018. The state of the art of dementia research: New frontiers.; London, 2018.
8. FAGUNDES, S. D.; SILVA, M. T.; THEES, M. F. R. S. & PEREIRA, M. G. "Prevalence of dementia among elderly Brazilians: a systematic review". *Sao Paulo Med. J.* **129**: 46, 2011.
9. PETERSEN, R. C.; DOODY, R.; KURZ, A.; MOHS, R. C.; MORRIS, J. C.; RABINS, P. V; RITCHIE, K.; ROSSOR, M.; THAL, L. & WINBLAD, B. "Current concepts in mild cognitive impairment.". *Arch. Neurol.* **58**: 1985, 2001.
10. ALBERT, M. S.; DEKOSKY, S. T.; DICKSON, D.; DUBOIS, B.; FELDMAN, H. H.; FOX, N. C.; GAMST, A.; HOLTZMAN, D. M.; JAGUST, W. J.; PETERSEN, R. C.; SNYDER, P. J.; CARRILLO, M. C.; THIES, B. & PHELPS, C. H. "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's

- disease.". *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* **7**: 270, 2011.
11. BURNS, A. & ZAUDIG, M. "Mild cognitive impairment in older people.". *Lancet (London, England)* **360**: 1963, 2002.
 12. ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2018 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia* **14**: (2018).
 13. SCHELTENS, P.; BLENNOW, K.; BRETHER, M. M. B.; DE STROOPER, B.; FRISONI, G. B.; SALLOWAY, S. & VAN DER FLIER, W. M. "Alzheimer's disease". *Lancet* **388**: 505, 2016.
 14. ODDO, S.; CACCAMO, A.; SHEPHERD, J. D.; MURPHY, M. P.; GOLDE, T. E.; KAYED, R.; METHERATE, R.; MATTSON, M. P.; AKBARI, Y. & LAFERLA, F. M. "Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction". *Neuron* **39**: 409, 2003.
 15. ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Viagem ao Cérebro. A Doença de Alzheimer e o Cérebro, 2019. Disponível em https://www.alz.org/brain_portuguese.
 16. TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M.-Y. "Pathological tau: a loss of normal function or a gain in toxicity?". *Nat Neurosci* **8**: 1136, 2005.
 17. MORISHIMA-KAWASHIMA, M. & IHARA, Y. "Alzheimer's disease: β -Amyloid protein and tau". *J. Neurosci. Res.* **70**: 392, 2002.
 18. ALVES, L.; CORREIA, A. S. A.; MIGUEL, R.; ALEGRIA, P. & BUGALHO, P. "Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review.". *Front. Neurol.* **3**: 63, 2012.
 19. LICHTENTHALER, S. F. "Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential". *J. Neurochem.* **116**: 10, 2011.
 20. ITTNER, L. M. & GOTZ, J. "Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease.". *Nat. Rev. Neurosci.* **12**: 65, 2011.
 21. O'BRIEN, R. J. & WONG, P. C. "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease". *Annu. Rev. Neurosci.* **34**: 185, 2011.
 22. EVIN, G.; ZHU, A.; HOLSINGER, R. M. D.; MASTERS, C. L. & LI, Q.-X. "Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets.". *J. Neurosci. Res.* **74**: 386, 2003.
 23. KAMETANI, F. & HASEGAWA, M. "Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease". *Front. Neurosci.* **12**: 25, 2018.

24. SOLOMON, A.; MANGIALASCHE, F.; RICHARD, E.; ANDRIEU, S.; BENNETT, D. A.; BRETELER, M.; FRATIGLIONI, L.; HOOSHMAND, B.; KHACHATURIAN, A. S.; SCHNEIDER, L. S.; SKOOG, I. & KIVIPELTO, M. "Advances in the prevention of Alzheimer's disease and dementia". *J. Intern. Med.* **275**: 229, 2014.
25. QIN, W.; HO, L.; WANG, J.; PESKIND, E. & PASINETTI, G. M. "S100A7, a novel Alzheimer's disease biomarker with non-amyloidogenic alpha-secretase activity acts via selective promotion of ADAM-10.". *PLoS One* **4**: e4183, 2009.
26. NORDBERG, A. "Dementia in 2014: Towards early diagnosis in Alzheimer disease". *Nat Rev Neurol* **11**: 69, 2015.
27. PRINCE, M.; BRYCE, R. & FERRI, C. "World Alzheimer Report 2011. The benefits of early diagnosis and intervention". *Published by Alzheimer's Disease International (ADI) 2011*.
28. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria Conjunta nº 13, de 28 de novembro de 2017. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Alzheimer; 2017.
29. MCKHANN, G. M.; KNOPMAN, D. S.; CHERTKOW, H.; HYMAN, B. T.; JACK, C. R. J.; KAWAS, C. H.; KLUNK, W. E.; KOROSHETZ, W. J.; MANLY, J. J.; MAYEUX, R.; MOHS, R. C.; MORRIS, J. C.; ROSSOR, M. N.; SCHELTENS, P.; CARRILLO, M. C.; THIES, B.; WEINTRAUB, S. & PHELPS, C. H. "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease.". *Alzheimers. Dement.* **7**: 263, 2011.
30. FERRIS, S. H. & YAN, B. "Differential Diagnosis and Clinical Assessment of Patients With Severe Alzheimer Disease". *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **17**: 92, 2003.
31. MORRIS, E.; CHALKIDOU, A.; HAMMERS, A.; PEACOCK, J.; SUMMERS, J. & KEEVIL, S. "Diagnostic accuracy of (18)F amyloid PET tracers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis.". *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **43**: 374, 2016.
32. MCNEILL, R.; SARE, G. M.; MANOHARAN, M.; TESTA, H. J.; MANN, D. M. A.; NEARY, D.; SNOWDEN, J. S. & VARMA, A. R. "Accuracy of single-photon emission computed tomography in differentiating frontotemporal dementia from Alzheimer's disease". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **78**: 350, 2007.

33. FRISONI, G. B.; FOX, N. C.; JACK, C. R.; SCHELTENS, P. & THOMPSON, P. M. "The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease". *Nat. Rev. Neurol.* **6**: 67, 2010.
34. TAKEUCHI, M.; SATO, T.; TAKINO, J.; KOBAYASHI, Y.; FURUNO, S.; KIKUCHI, S. & YAMAGISHI, S. "Diagnostic utility of serum or cerebrospinal fluid levels of toxic advanced glycation end-products (TAGE) in early detection of Alzheimer's disease.". *Med. Hypotheses* **69**: 1358, 2007.
35. HOOPER, C.; LOVESTONE, S.; SAINZ-FUERTES, R. "Alzheimer's Disease, Diagnosis and the Need for Biomarkers". *Biomark. Insight* **3**: 317, 2008.
36. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. *Biomarkers in risk assessment: validity and validation*; Geneva: World Health Organization., 2011.
37. MCCORQUODALE, D. & MYERS, A. J. "Biomarkers in the diagnosis and treatment of Alzheimer ' s disease : potential and pitfalls". *Biomark. Med.* **2**: 209, 2008.
38. HUMPEL, C. "Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease". *Trends Biotechnol.* **29**: 26, 2011.
39. HENRIKSEN, K.; O'BRYANT, S. E.; HAMPEL, H.; TROJANOWSKI, J. Q.; MONTINE, T. J.; JEROMIN, A.; BLENNOW, K.; LÖNNEBORG, A.; WYSS-CORAY, T.; SOARES, H.; BAZENET, C.; SJÖGREN, M.; HU, W.; LOVESTONE, S.; KARSDAL, M. A. & WEINER, M. W. "The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease". *Alzheimer's Dement.* **10**: 115, 2014.
40. HENRIKSEN, K.; O'BRYANT, S. E.; HAMPEL, H.; TROJANOWSKI, J. Q.; MONTINE, T. J.; JEROMIN, A.; BLENNOW, K.; LÖNNEBORG, A.; WYSS-CORAY, T.; SOARES, H.; BAZENET, C.; SJÖGREN, M.; HU, W.; LOVESTONE, S.; KARSDAL, M. A.; WEINER, M. W.; O'BRYANT, S. E.; HAMPEL, H.; TROJANOWSKI, J. Q.; MONTINE, T. J.; JEROMIN, A.; BLENNOW, K.; LÖNNEBORG, A.; WYSS-CORAY, T.; SOARES, H.; BAZENET, C.; SJÖGREN, M.; HU, W.; LOVESTONE, S.; KARSDAL, M. A. & WEINER, M. W. "The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease.". *Alzheimers. Dement.* **10**: 115, 2014.
41. BOON, J. M.; ABRAHAMS, P. H.; MEIRING, J. H. & WELCH, T. "Lumbar puncture: Anatomical review of a clinical skill". *Clin. Anat.* **17**: 544, 2004.
42. LUTZ, M. W.; SUNDSETH, S. S.; BURNS, D. K.; SAUNDERS, A. M.; HAYDEN, K. M.; BURKE, J. R.; WELSH-BOHMER, K. A. & ROSES, A. D.

- "A genetics-based biomarker risk algorithm for predicting risk of Alzheimer's disease". *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2**: 30, 2016.
43. SNYDER, H. M.; CARRILLO, M. C.; GRODSTEIN, F.; HENRIKSEN, K.; JEROMIN, A.; LOVESTONE, S.; MIELKE, M. M.; O'BRYANT, S.; SARASA, M.; SJØGREN, M.; SOARES, H.; TEELING, J.; TRUSHINA, E.; WARD, M.; WEST, T.; BAIN, L. J.; SHINEMAN, D. W.; WEINER, M. & FILLIT, H. M. "Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease". *Alzheimers. Dement.* **10**: 109, 2014.
 44. MARQUES, F.; SOUSA, J. C.; SOUSA, N.; PALHA, J. A. "Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease". *Mol. Neurodegener.* **38**: 1, 2013.
 45. ZIPSER, B. D.; JOHANSON, C. E.; GONZALEZ, L.; BERZIN, T. M.; TAVARES, R.; HULETTE, C. M.; VITEK, M. P.; HOVANESIAN, V. & STOPA, E. G. "Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease". *Neurobiol. Aging* **28**: 977, 2007.
 46. BRINKER, T.; STOPA, E.; MORRISON, J. & KLINGE, P. "A new look at cerebrospinal fluid circulation". *Fluids Barriers CNS* **11**: 10, 2014.
 47. HAMPEL, H.; SHEN, Y.; WALSH, D. M.; AISEN, P.; SHAW, L. M.; ZETTERBERG, H.; TROJANOWSKI, J. Q. & BLENNOW, K. "Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer's disease". *Exp. Neurol.* **223**: 334, 2010.
 48. SPERLING, R. A.; AISEN, P. S.; BECKETT, L. A.; BENNETT, D. A.; CRAFT, S.; FAGAN, A. M.; IWATSUBO, T.; JACK, C. R.; KAYE, J.; MONTINE, T. J.; PARK, D. C.; REIMAN, E. M.; ROWE, C. C.; SIEMERS, E.; STERN, Y.; YAFFE, K.; CARRILLO, M. C.; THIES, B.; MORRISON-BOGORAD, M.; WAGSTER, M. V & PHELPS, C. H. "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease". *Alzheimer's Dement.* **7**: 280, 2011.
 49. DUBOIS, B.; FELDMAN, H. H.; JACOVA, C.; HAMPEL, H.; MOLINUEVO, J. L.; BLENNOW, K.; DEKOSKY, S. T.; GAUTHIER, S.; SELKOE, D.; BATEMAN, R.; CAPPA, S.; CRUTCH, S.; ENGELBORGHIS, S.; FRISONI, G. B.; FOX, N. C.; GALASKO, D.; HABERT, M.-O.; JICHA, G. A.; NORDBERG, A.; PASQUIER, F.; RABINOVICI, G.; ROBERT, P.; ROWE, C.; SALLOWAY, S.; SARAZIN, M.; EPELBAUM, S.; DE SOUZA, L. C.; VELLAS, B.; VISSER, P. J.; SCHNEIDER, L.; STERN, Y.; SCHELTENS, P. & CUMMINGS, J. L. "Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria". *Lancet Neurol.* **13**: 614,

2014.

50. NABERS, A.; OLLESCH, J.; SCHATNER, J.; KÖTTING, C.; GENIUS, J.; HAFERMANN, H.; KLAFKI, H.; GERWERT, K. & WILTFANG, J. "Amyloid- β -Secondary Structure Distribution in Cerebrospinal Fluid and Blood Measured by an Immuno-Infrared-Sensor: A Biomarker Candidate for Alzheimer's Disease". *Anal. Chem.* **88**: 2755, 2016.
51. SIMONSEN, A. H.; HERUKKA, S.-K.; ANDREASEN, N.; BALDEIRAS, I.; BJERKE, M.; BLENNOW, K.; ENGELBORGHES, S.; FRISONI, G. B.; GABRYELEWICZ, T.; GALLUZZI, S.; HANDELS, R.; KRAMBERGER, M. G.; KULCZYŃSKA, A.; MOLINUEVO, J. L.; MROCZKO, B.; NORDBERG, A.; OLIVEIRA, C. R.; OTTO, M.; RINNE, J. O.; ROT, U.; SAKA, E.; SOININEN, H.; STRUYFS, H.; SUARDI, S.; VISSER, P. J.; WINBLAD, B.; ZETTERBERG, H. & WALDEMAR, G. "Recommendations for CSF AD biomarkers in the diagnostic evaluation of dementia". *Alzheimer's Dement.* **13**: 274, 2017.
52. HUMPEL, C. & HOCHSTRASSER, T. "Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in Alzheimer's disease". *World J. Psychiatry* **1**: 8, 2011.
53. HANSSON, S. F.; ANDREASSON, U.; WALL, M.; SKOOG, I.; ANDREASEN, N.; WALLIN, A.; ZETTERBERG, H. & BLENNOW, K. "Reduced levels of amyloid-beta-binding proteins in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients.". *J. Alzheimers. Dis.* **16**: 389, 2009.
54. LEWCZUK, P.; ESSELMANN, H.; BIBL, M.; PAUL, S.; SVITEK, J.; MIERTSCHISCHK, J.; MEYRER, R.; SMIRNOV, A.; MALER, J. M.; KLEIN, C.; OTTO, M.; BLEICH, S.; SPERLING, W.; KORNHUBER, J.; RUTHER, E. & WILTFANG, J. "Electrophoretic separation of amyloid beta peptides in plasma.". *Electrophoresis* **25**: 3336, 2004.
55. MANZINE, P. R.; DE FRANÇA BRAM, J. M.; BARHAM, E. J.; DO VALE, F. de A. C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; COMINETTI, M. R. & IOST PAVARINI, S. C. "ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: a study with Brazilian elderly". *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **35**: 58, 2013.
56. POSTINA, R.; SCHROEDER, A.; DEWACHTER, I.; BOHL, J.; SCHMITT, U.; KOJRO, E.; PRINZEN, C.; ENDRES, K.; HIEMKE, C.; BLESSING, M.; FLAMEZ, P.; DEQUENNE, A.; GODAUX, E.; VAN LEUVEN, F. & FAHRENHOLZ, F. "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model.". *J. Clin. Invest.* **113**: 1456, 2004.
57. JORISSEN, E.; PROX, J.; BERNREUTHER, C.; WEBER, S.;

- SCHWANBECK, R.; SERNEELS, L.; SNELLINX, A.; CRAESSAERTS, K.; THATHIAH, A.; TESSEUR, I.; BARTSCH, U.; WESKAMP, G.; BLOBEL, C. P.; GLATZEL, M.; DE STROOPER, B. & SAFTIG, P. "The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex.". *J. Neurosci.* **30**: 4833, 2010.
58. KUHN, P.-H.; WANG, H.; DISLICH, B.; COLOMBO, A.; ZEITSCHER, U.; ELLWART, J. W.; KREMMER, E.; ROSSNER, S. & LICHTENTHALER, S. F. "ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons.". *EMBO J.* **29**: 3020, 2010.
59. SAFTIG, P. & LICHTENTHALER, S. F. "The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain.". *Prog. Neurobiol.* **135**: 1, 2015.
60. TOUSSEYN, T.; THATHIAH, A.; JORISSEN, E.; RAEMAEEKERS, T.; KONIETZKO, U.; REISS, K.; MAES, E.; SNELLINX, A.; SERNEELS, L.; NYABI, O.; ANNAERT, W.; SAFTIG, P.; HARTMANN, D. & DE STROOPER, B. "ADAM10, the Rate-limiting Protease of Regulated Intramembrane Proteolysis of Notch and Other Proteins, Is Processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the γ -Secretase". *J. Biol. Chem.* **284**: 11738, 2009.
61. MANZINE, P. R.; BARHAM, E. J.; VALE, F. de A. C. do; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; IOST PAVARINI, S. C. & COMINETTI, M. R. "Correlation Between Mini-Mental State Examination and Platelet ADAM10 Expression in Alzheimer's Disease". *J. Alzheimer's Dis.* **36**: 253, 2013.
62. MANZINE, P.; BARHAM, E.; DE ASSIS CARVALHO VALE, F.; ARAÚJO, H.; COMINETTI, M. & PAVARINI, S. "Platelet ADAM10 levels in elderly with mild Alzheimer's disease". *Alzheimer's Dement.* **8**: P284, 2012.
63. MANZINE, P. R.; MARCELLO, E.; BORRONI, B.; KAMPHUIS, W.; HOL, E.; PADOVANI, A.; NASCIMENTO, C. C.; DE GODOY BUENO, P.; ASSIS CARVALHO VALE, F.; IOST PAVARINI, S. C.; DI LUCA, M. & COMINETTI, M. R. "ADAM10 gene expression in the blood cells of Alzheimer's disease patients and mild cognitive impairment subjects.". *Biomarkers* **20**: 196, 2015.
64. DIAMANDIS, E.; CHRISTOPOULOS, T. *Immunoassay*. 1a ed. Academic Press, San Diego, 1996.
65. VASHIST, S. & LUONG, J. *Handbook of Immunoassay Technologies. Approaches, Performances, and Applications*. 1a ed. Academic Press, 2018.
66. AYDIN, S. "A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory

- experience with peptide/protein analyses using ELISA". *Peptides* **72**: 4, 2015.
67. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo, 2006.
 68. THERMO-FISHER-SCIENTIFIC. "Thermo Scientific Pierce Assay Development Technical Handbook Version 2". *Tech. Handb.* **2**: 1, 2011.
 69. BIO-RAD LABORATORIES. "ELISA Basics Guide". 1, 2017. Disponível em <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2017/an-introduction-to-elisa/elisa-basics-guide.pdf>.
 70. DARWISH, I. A. "Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis : Basic Methodology and Recent Advances". *Int. J. Biomed. Science* **2**: 217, 2006.
 71. DAVIES, C. "Chapter 2.1 - Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA). IN: *The Immunoassay Handbook*. WILD, D. 4a ed., Oxford, Elsevier Science, 2013.
 72. HE, J. "Chapter 5.1 - Practical Guide to ELISA Development. IN: *The Immunoassay Handbook*. WILD, D. 4a ed., Oxford, Elsevier Science, 2013.
 73. NUNES, G. S. "Metodos imunoquimicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estados da arte e perspectivas.". *Quim. Nova* **28**: 462, 2005.
 74. DAVIES, C. " Cap. 1 - Introduction to immunoassay principles. IN: *The Immunoassay Handbook*. WILD, D. 4a ed., Oxford, Elsevier Science, 2013.
 75. DOU, Y.; LV, Y.; ZHOU, X.; HE, L.; LIU, L.; LI, P.; SUN, Y.; WANG, M.; GAO, M. & WANG, C. "Antibody-sandwich ELISA analysis of a novel blood biomarker of CST4 in gastrointestinal cancers". *Onco. Targets. Ther.* **11**: 1743, 2018.
 76. OURRADI, K.; XU, Y.; DE SENY, D.; KIRWAN, J.; BLOM, A. & SHARIF, M. "Development and validation of novel biomarker assays for osteoarthritis". *PLoS One* **12**: e0181334, 2017.
 77. CHISWICK, E. L.; DUFFY, E.; JAPP, B. & REMICK, D. "Detection and quantification of cytokines and other biomarkers". *Methods Mol. Biol.* **844**: 15, 2012.
 78. ZHANG, Y.; BIRRU, R. & DI, Y. P. "Analysis of clinical and biological samples using microsphere-based multiplexing Luminex system.". *Methods Mol. Biol.* **1105**: 43, 2014.

79. LE BASTARD, N.; COART, E.; VANDERSTICHELE, H.; VANMECHELEN, E.; MARTIN, J.-J. & ENGELBORGHES, S. "Comparison of two analytical platforms for the clinical qualification of Alzheimer's disease biomarkers in pathologically-confirmed dementia.". *J. Alzheimers. Dis.* **33**: 117, 2013.
80. GUO, X. & TANG, K. "Mass Spectrometry-Based Assay for High-Throughput and High-Sensitivity Biomarker Verification". *Protein Analysis using Mass Spectrometry* 2017. doi:doi:10.1002/9781119371779.ch9
81. KOOMEN, J. M. "Immunoglobulins: Expanding the Role for Mass Spectrometry in Protein Biomarker Quantification". *Clin. Chem.* **60**: 1034 LP, 2014.
82. LEONARD, M.; DUNN, J. & SMITH, G. "A clinical biomarker assay for the quantification of d3-creatinine and creatinine using LC-MS/MS.". *Bioanalysis* **6**: 745, 2014.
83. RUSLING, J. F.; KUMAR, C. V.; GUTKIND, J. S. & PATEL, V. "Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer". *Analyst* **135**: 2496, 2010.
84. ULIANA, C. V. C. V.; PEVERARI, C. R. C. R.; AFONSO, A. S. A. S.; COMINETTI, M. R. & FARIA, R. C. R. C. "Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker". *Biosens. Bioelectron.* **99**: 156, 2018.
85. OTIENO, B. A.; KRAUSE, C. E.; JONES, A. L.; KREMER, R. B. & RUSLING, J. F. "Cancer Diagnostics via Ultrasensitive Multiplexed Detection of Parathyroid Hormone-Related Peptides with a Microfluidic Immunoarray". *Anal. Chem.* **88**: 9269, 2016.
86. OTIENO, B. A.; KRAUSE, C. E.; LATUS, A.; CHIKKAVEERAIHAH, B. V.; FARIA, R. C. & RUSLING, J. F. "On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers". *Biosens. Bioelectron.* **53**: 268, 2014.
87. CHIKKAVEERAIHAH, B. V.; MANI, V.; PATEL, V.; GUTKIND, J. S. & RUSLING, J. F. "Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum". *Biosens. Bioelectron.* **26**: 4477, 2011.
88. MALHOTRA, R.; PATEL, V.; CHIKKAVEERAIHAH, B. V.; MUNGE, B. S.; CHEONG, S. C.; ZAIN, R. B.; ABRAHAM, M. T.; DEY, D. K.; GUTKIND, J. S. & RUSLING, J. F. "Ultrasensitive Detection of Cancer Biomarkers in the Clinic by Use of a Nanostructured Microfluidic Array". *Anal. Chem.* **84**: 6249,

2012.

89. THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A. & WILSON, G. S. "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification". *Biosens. Bioelectron.* **16**: 121, 2001.
90. MOINA, C.; YBARRA, G. "Fundamentals and Applications of Immunosensors". IN: *Advances in Immunoassay Technology*. CHIU, N. IntechOpen, 2012. doi:10.5772/36947.
91. WANG, H., SHEN, G.; YU, R. "CHAPTER 9 - Aspects of recent development of immunosensors". IN: *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*. ZHANG, X., JU, H.; WANG, J. 1a ed. Academic Press, San Diego, 2008. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50011-8>.
92. FOWLER, J. M., WONG, D. K. Y., HALSALL, H. B. & HEINEMAN, W. R. "CHAPTER 5 - Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors". IN: *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*. ZHANG, X., JU, H.; WANG, J. 1a ed. Academic Press, San Diego, 2008. doi: [10.1016/B978-012373738-0.50007-6](https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50007-6).
93. CHAKRABORTY, S. *Microfluidics and Microscale Transport Processes*. 1a ed. CRC Press, 2012.
94. WHITESIDES, G. M. "The origins and the future of microfluidics". *Nature* **442**: 368, 2006.
95. DE OLIVEIRA, R. A. G.; MATERON, E. M.; MELENDEZ, M. E.; CARVALHO, A. L. & FARIA, R. C. "Disposable Microfluidic Immunoarray Device for Sensitive Breast Cancer Biomarker Detection". *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**: 27433, 2017.
96. GUBALA, V.; HARRIS, L. F.; RICCO, A. J.; TAN, M. X. & WILLIAMS, D. E. "Point of care diagnostics: Status and future". *Anal. Chem.* **84**: 487, 2012.
97. MOHAMMED, M.-I. & DESMULLIEZ, M. P. Y. "Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review". *Lab Chip* **11**: 569, 2010.
98. LI, S.-S.; LIN, C.-W.; WEI, K.-C.; HUANG, C.-Y.; HSU, P.-H.; LIU, H.-L.; LU, Y.-J.; LIN, S.-C.; YANG, H.-W. & MA, C.-C. M. "Non-invasive screening for early Alzheimer's disease diagnosis by a sensitively immunomagnetic biosensor". *Sci. Rep.* **6**: 25155, 2016.
99. RAMA, E. C.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B. & COSTA-GARCÍA, A. "Competitive electrochemical immunosensor for amyloid-beta 1-42 detection

- based on gold nanostructured Screen-Printed Carbon Electrodes". *Sensors Actuators B Chem.* **201**: 567, 2014.
100. LIU, L.; HE, Q.; ZHAO, F.; XIA, N.; LIU, H.; LI, S.; LIU, R. & ZHANG, H. "Competitive electrochemical immunoassay for detection of β -amyloid (1–42) and total β -amyloid peptides using p-aminophenol redox cycling". *Biosens. Bioelectron.* **51**: 208, 2014.
 101. YU, Y.; SUN, X.; TANG, D.; LI, C.; ZHANG, L.; NIE, D.; YIN, X. & SHI, G. "Gelsolin bound β -amyloid peptides(1–40/1–42): Electrochemical evaluation of levels of soluble peptide associated with Alzheimer's disease". *Biosens. Bioelectron.* **68**: 115, 2015.
 102. CARNEIRO, P.; LOUREIRO, J.; DELERUE-MATOS, C.; MORAIS, S. & DO CARMO PEREIRA, M. "Alzheimer's disease: Development of a sensitive label-free electrochemical immunosensor for detection of amyloid beta peptide". *Sensors Actuators B Chem.* **239**: 157, 2017.
 103. DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; PLICHTA, Z.; HORÁK, D. & MERKOČI, A. "Alzheimer's disease biomarkers detection in human samples by efficient capturing through porous magnetic microspheres and labelling with electrocatalytic gold nanoparticles.". *Biosens. Bioelectron.* **67**: 162, 2015.
 104. DIBA, F. S.; KIM, S. & LEE, H. J. "Electrochemical immunoassay for amyloid-beta 1–42 peptide in biological fluids interfacing with a gold nanoparticle modified carbon surface". *Catal. Today* **295**: 41, 2017.
 105. LIEN, T. T. N.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E. & VESTERGAARD, M. C. "Modified screen printed electrode for development of a highly sensitive label-free impedimetric immunosensor to detect amyloid beta peptides". *Anal. Chim. Acta* **892**: 69, 2015.
 106. WU, C.-C.; KU, B.-C.; KO, C.-H.; CHIU, C.-C.; WANG, G.-J.; YANG, Y.-H. & WU, S.-J. "Electrochemical impedance spectroscopy analysis of A-beta (1-42) peptide using a nanostructured biochip". *Electrochim. Acta* **134**: 249, 2014.
 107. RUSHWORTH, J. V; AHMED, A.; GRIFFITHS, H. H.; POLLOCK, N. M.; HOOPER, N. M. & MILLNER, P. A. "A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers". *Biosens. Bioelectron.* **56**: 83, 2014.
 108. DE OLIVEIRA, T. R.; MARTUCCI, D. H. & FARIA, R. C. "Simple disposable microfluidic device for Salmonella typhimurium detection by magneto-immunoassay". *Sensors Actuators B Chem.* **255**: 684, 2018.
 109. SARDESAI, N. P.; KADIMISSETTY, K.; FARIA, R. & RUSLING, J. F. "A

- microfluidic electrochemiluminescent device for detecting cancer biomarker proteins". *Anal. Bioanal. Chem.* **405**: 3831, 2013.
110. KURAMITZ, H. "Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays". *Anal. Bioanal. Chem.* **394**: 61, 2009.
 111. XU, Y. & WANG, E. "Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles". *Electrochim. Acta* **84**: 62, 2012.
 112. MANI, V.; WASALATHANTHRI, D. P.; JOSHI, A. A.; KUMAR, C. V & RUSLING, J. F. "Highly efficient binding of paramagnetic beads bioconjugated with 100,000 or more antibodies to protein-coated surfaces.". *Anal. Chem.* **84**: 10485, 2012.
 113. PAL, S. & ALOCILJA, E. C. "Electrically active magnetic nanoparticles as novel concentrator and electrochemical redox transducer in *Bacillus anthracis* DNA detection.". *Biosens. Bioelectron.* **26**: 1624, 2010.
 114. HASANZADEH, M.; SHADJOU, N. & DE LA GUARDIA, M. "Iron and iron-oxide magnetic nanoparticles as signal-amplification elements in electrochemical biosensing". *TrAC Trends Anal. Chem.* **72**: 1, 2015.
 115. AFSHARAN, H.; KHALILZADEH, B.; TAJALLI, H.; MOLLABASHI, M.; NAVAEIPOUR, F. & RASHIDI, M.-R. "A sandwich type immunosensor for ultrasensitive electrochemical quantification of p53 protein based on gold nanoparticles/graphene oxide". *Electrochim. Acta* **188**: 153, 2016.
 116. JAZAYERI, M. H.; AMANI, H.; POURFATOLLAH, A. A.; PAZOKI-TOROUDI, H. & SEDIGHIMOUGHADDAM, B. "Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies". *Sens. Bio-Sensing Res.* **9**: 17, 2016.
 117. KHASHAYAR, P.; AMOABEDINY, G.; LARIJANI, B.; HOSSEINI, M. & VANFLETEREN, J. "Fabrication and Verification of Conjugated AuNP-Antibody Nanoprobe for Sensitivity Improvement in Electrochemical Biosensors". *Sci. Rep.* **7**: 16070, 2017.
 118. MANI, V.; CHIKKAVEERIAIAH, B. V; PATEL, V.; GUTKIND, J. S. & RUSLING, J. F. "Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification". *ACS Nano* **3**: 585, 2009.
 119. DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; PAROLO, C. & MERKOÇI, A. "Immunosensing using nanoparticles". *Mater. Today* **13**: 24, 2010.
 120. HIGASHI, Y.; MAZUMDER, J.; YOSHIKAWA, H.; SAITO, M. & TAMIYA, E. "Chemically Regulated ROS Generation from Gold

- Nanoparticles for Enzyme-Free Electrochemiluminescent Immunosensing". *Anal. Chem.* **90**: 5773, 2018.
121. KRAUSE, C. E.; OTIENO, B. A.; BISHOP, G. W.; PHADKE, G.; CHOQUETTE, L.; LALLA, R. V; PETERSON, D. E. & RUSLING, J. F. "Ultrasensitive microfluidic array for serum pro-inflammatory cytokines and C-reactive protein to assess oral mucositis risk in cancer patients.". *Anal. Bioanal. Chem.* **407**: 7239, 2015.
 122. PAGADUAN, J. V; SAHORE, V. & WOOLLEY, A. T. "APPLICATIONS OF MICROFLUIDICS AND MICROCHIP ELECTROPHORESIS FOR POTENTIAL CLINICAL BIOMARKER ANALYSIS". *Anal. Bioanal. Chem.* **407**: 6911, 2015.
 123. HERR, A. M. Y. E.; HATCH, A. V; GIANNOBILE, W. V; THROCKMORTON, D. J.; TRAN, H. U. U. M.; BRENNAN, J. S. & SINGH, A. K. "Integrated Microfluidic Platform for Oral Diagnostics". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1098**: 362, 2007.
 124. AFONSO, A. S.; ULIANA, C. V.; MARTUCCI, D. H. & FARIA, R. C. "Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical Cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor Applications". *Talanta* **146**: 381, 2015.
 125. DE OLIVEIRA, R. A. G.; MATERÓN, E. M.; MELENDEZ, M. E.; CARVALHO, A. L. & FARIA, R. C. "Disposable Microfluidic Immunoarray Device for Sensitive Breast Cancer Biomarker Detection". *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**: 27433, 2017.
 126. SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; BRIMACOMBE, K.; GROSSMAN, A.; ARKIN, M.; AULD, D.; AUSTIN, C.; BAELL, J.; BEJCEK, B.; CAAVEIRO, J. M. M.; CHUNG, T. D. Y.; DAHLIN, J. L.; DEVANARYAN, V.; FOLEY, T. L.; GLICKSMAN, M.; HALL, M. D.; HAAS, J. V; INGLESE, J.; IVERSEN, P. W.; KAHL, S. D.; KALES, S. C.; LAL-NAG, M.; LI, Z.; MCGEE, J.; MCMANUS, O.; RISS, T.; TRASK, O. J. O. J.; WEIDNER, J. R.; WILDEY, M. J.; XIA, M. & XU, X. *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
 127. ABCAM. "ELISA guide". Available at: <https://www.abcam.com/protocols/the-complete-elisa-guide>.
 128. PFEFFER, R. I.; KUROSAKI, T. T.; HARRAH, C. H. J.; CHANCE, J. M. & FILOS, S. "Measurement of functional activities in older adults in the community.". *J. Gerontol.* **37**: 323, 1982.

129. FOLSTEIN, M. F.; FOLSTEIN, S. E. & MCHUGH, P. R. "“Mini-mental state”: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician". *J. Psychiatr. Res.* **12**: 189, 1975.
130. "World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects.". *JAMA* **310**: 2191, 2013.
131. FORLENZA, O. V; RADANOVIC, M.; TALIB, L. L.; APRAHAMIAN, I.; DINIZ, B. S.; ZETTERBERG, H. & GATTAZ, W. F. "Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer’s disease: Diagnostic accuracy and prediction of dementia.". *Alzheimer’s Dement.* **1**: 455, 2015.
132. MANDREKAR, J. N. "Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment". *J. Thorac. Oncol.* **5**: 1315, 2010.
133. METZ, C. E. "ROC analysis in medical imaging: a tutorial review of the literature.". *Radiol. Phys. Technol.* **1**: 2, 2008.
134. KRZANOWSKI, W. J. & HAND, D. J. *ROC Curves for Continuous Data*. 1a ed. Chapman & Hall/CRC, 2009.
135. SHAIK, M.; RAO, V. K.; GUPTA, M. & PANDEY, P. "Layer-by-layer self-assembling copper tetrasulfonated phthalocyanine on carbon nanotube modified glassy carbon electrode for electro-oxidation of 2-mercaptoethanol". *Thin Solid Films* **526**: 256, 2012.
136. YOUNGSTROM, E. A. "A primer on receiver operating characteristic analysis and diagnostic efficiency statistics for pediatric psychology: we are ready to ROC". *J. Pediatr. Psychol.* **39**: 204, 2014.
137. SOGORB-ESTEVE, A.; GARCIA-AYLLON, M.-S.; GOBOM, J.; ALOM, J.; ZETTERBERG, H.; BLENNOW, K. & SAEZ-VALERO, J. "Levels of ADAM10 are reduced in Alzheimer’s disease CSF.". *J. Neuroinflammation* **15**: 213, 2018.
138. COLCIAGHI, F.; MARCELLO, E.; BORRONI, B.; ZIMMERMANN, M.; CALTAGIRONE, C.; CATTABENI, F.; PADOVANI, A. & DI LUCA, M. "Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease.". *Neurology* **62**: 498, 2004.
139. RICCARDI, C. dos S.; COSTA, P. I. da & YAMANAKA, H. "Imunossensor amperométrico". *Quim. Nova* **25**: 316, 2002.
140. PEDROSO, M. M.; WATANABE, A. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BUENO, P. R. & FARIA, R. C. "Quartz Crystal Microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass". *Microchem. J.* **89**: 153, 2008.

141. AFONSO, A. S.; ZANETTI, B. F.; SANTIAGO, A. C.; HENRIQUE-SILVA, F.; MATTOSO, L. H. C. & FARIA, R. C. "QCM immunoassay for recombinant cysteine peptidase: A potential protein biomarker for diagnosis of citrus canker". *Talanta* **104**: 193, 2013.
142. DYNAMICBIOSENSORS. *Binding Theory - Equations for Affinity and Kinetics Analysis*. Disponível em https://www.dynamic-biosensors.com/wpcms/wp-content/uploads/2017/01/TechNote_Binding-Theory.pdf.
143. KURIYAN, J.; KONFORTI, B. & WEMMER, D. *The Molecules of Life: Physical and Chemical Principles*. Taylor & Francis Group, 2013.
144. NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5a ed., New York, W. H. Freeman, 2008.
145. ABCAM. "KD value: a quantitative measurement of antibody affinity". Disponível em: <https://www.abcam.com/primary-antibodies/kd-value-a-quantitative-measurement-of-antibody-affinity>.
146. STEFANESCU, R.; LUPU, L.; MANEA, M.; IACOB, R. E. & PRZYBYLSKI, M. "Molecular characterization of the beta-amyloid(4-10) epitope of plaque specific Abeta antibodies by affinity-mass spectrometry using alanine site mutation.". *J. Pept. Sci.* **24**: 2018.
147. LUE, L.-F.; GUERRA, A. & WALKER, D. G. "Amyloid Beta and Tau as Alzheimer's Disease Blood Biomarkers: Promise From New Technologies". *Neurol. Ther.* **6**: 25, 2017.
148. JANELIDZE, S.; STOMRUD, E.; PALMQVIST, S.; ZETTERBERG, H.; VAN WESTEN, D.; JEROMIN, A.; SONG, L.; HANLON, D.; TAN HEHIR, C. A.; BAKER, D.; BLENNOW, K. & HANSSON, O. "Plasma β -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease". *Sci. Rep.* **6**: 26801, 2016.
149. RUIZ, A.; PESINI, P.; ESPINOSA, A.; PÉREZ-GRIJALBA, V.; VALERO, S.; SOTOLONGO-GRAU, O.; ALEGRET, M.; MONLEÓN, I.; LAFUENTE, A.; BUENDÍA, M.; IBARRIA, M.; RUIZ, S.; HERNÁNDEZ, I.; SAN JOSÉ, I.; TÁRRAGA, L.; BOADA, M. & SARASA, M. "Blood amyloid beta levels in healthy, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease individuals: replication of diastolic blood pressure correlations and analysis of critical covariates". *PLoS One* **8**: e81334, 2013.
150. LI, Y.; XIONG, Y.; FANG, L.; JIANG, L.; HUANG, H.; DENG, J.; LIANG, W. & ZHENG, J. "An Electrochemical Strategy using Multifunctional Nanoconjugates for Efficient Simultaneous Detection of Escherichia coli O157 : H7 and Vibrio cholerae O1". *Theranostics* **7**: 935, 2017.

151. CHUNGLOK, W.; KHOWNARUMIT, P.; RIJIRAVANICH, P.; SOMASUNDRUM, M. & SURAREUNGCHAI, W. "Electrochemical immunoassay platform for high sensitivity protein detection based on redox-modified carbon nanotube labels". *Analyst* **136**: 2969, 2011.
152. PHADKE, G. S.; SATTERWHITE-WARDEN, J. E.; CHOUDHARY, D.; TAYLOR, J. A. & RUSLING, J. F. "A novel and accurate microfluidic assay of CD62L in bladder cancer serum samples". *Analyst* **143**: 5505, 2018.
153. PEREZ-GRIJALBA, V.; FANDOS, N.; CANUDAS, J.; INSUA, D.; CASABONA, D.; LACOSTA, A. M.; MONTANES, M.; PESINI, P. & SARASA, M. "Validation of Immunoassay-Based Tools for the Comprehensive Quantification of Abeta40 and Abeta42 Peptides in Plasma.". *J. Alzheimers. Dis.* **54**: 751, 2016.
154. STOOP, M. P.; COULIER, L.; ROSENLING, T.; SHI, S.; SMOLINSKA, A. M.; BUYDENS, L.; AMPT, K.; STINGL, C.; DANE, A.; MUILWIJK, B.; LUITWIELER, R. L.; SILLEVIS SMITT, P. A. E.; HINTZEN, R. Q.; BISCHOFF, R.; WIJMENGA, S. S.; HANKEMEIER, T.; VAN GOOL, A. J. & LUIDER, T. M. "Quantitative proteomics and metabolomics analysis of normal human cerebrospinal fluid samples". *Mol. Cell. Proteomics* **9**: 2063, 2010.
155. SHAW, L. M.; WALIGORSKA, T.; FIELDS, L.; KORECKA, M.; FIGURSKI, M.; TROJANOWSKI, J. Q.; EICHENLAUB, U.; WAHL, S.; QUAN, M.; PONTECORVO, M. J.; LACHNO, D. R.; TALBOT, J. A.; ANDERSEN, S. W.; SIEMERS, E. R. & DEAN, R. A. "Derivation of cutoffs for the Elecsys® amyloid β (1–42) assay in Alzheimer's disease". *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.* **10**: 698, 2018.
156. BERTENS, D.; TIJMS, B. M.; SCHELTENS, P.; TEUNISSEN, C. E. & VISSER, P. J. "Unbiased estimates of cerebrospinal fluid β -amyloid 1–42 cutoffs in a large memory clinic population". *Alzheimers. Res. Ther.* **9**: 8, 2017.
157. MAGALHÃES, C. A.; FIGUEIRÓ, M.; FRAGA, V. G.; MATEO, E. C.; TOLEDO, A. A. S. F.; CARVALHO, M. das G.; CARAMELLI, P. & GOMES, K. B. "Cerebrospinal fluid biomarkers for the differential diagnosis of Alzheimer's disease". *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **51**: 376, 2015.
158. MOREIRA, F. T. C.; RODRIGUEZ, B. A. G.; DUTRA, R. A. F. & SALES, M. G. F. "Redox probe-free readings of a β -amyloid-42 plastic antibody sensory material assembled on copper@carbon nanotubes". *Sensors Actuators B Chem.* **264**: 1, 2018.
159. NEGAHDARY, M. & HELI, H. "An ultrasensitive electrochemical aptasensor

for early diagnosis of Alzheimer's disease, using a fern leaves-like gold nanostructure". *Talanta* **198**: 510, 2019.