

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

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS E DE
BAIXO CUSTO PARA A DETECÇÃO DE BIOMARCADORES
RELACIONADOS AO CÂNCER DE COLO UTERINO E
ENDOMETRIAL**

Tháísa Aparecida Baldo*

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

Orientador(a): Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

*** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**

**São Carlos - SP
2019**



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Thaisa Aparecida Baldo, realizada em 31/05/2019:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
UFSCar

Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
UNESP

Prof. Dr. Flavio Makoto Shimizu
CNPEM

Profa. Dra. Marystela Ferreira
UFSCar

Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira de Souza
UFSCar

“Enquanto houver um louco, um poeta e um amante haverá sonho, amor e fantasia.
E enquanto houver sonho, amor e fantasia, haverá esperança.” — William
Shakespeare

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito curta, para ser insignificante” — Charlie Chaplin

"Só quem mira a lua, sabe que o sonho começa aonde a gravidade termina" — Alan
Castro Dias

“Leve a vida como aprender a coreografia de uma música: você vai errar muitas vezes, acertar outras e inventar novos passos, de maneira a aperfeiçoar cada detalhe. Uns vão te seguir, outros vão te criticar e outros vão se aperfeiçoar e se inventar diante do que você criou”. Thaísa Baldo

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida, força e por agir nos mínimos detalhes. Ao meu “pai-aço” Denivaldo, por ser minha fortaleza, apoiando-me em minhas decisões com muito carinho, amor e zelo. A minha mãe “mulher-maravilha” Francisca pelo amor incondicional, compreensão e dedicação. A minha irmã Tamara pelo amor, apoio e carinho. E por fim, ao meu amor Vitor, meu companheiro, que foi muito mais que meu braço direito, ajudou-me em todas as etapas com muito amor, carinho e paciência. A vocês AMORES DA MINHA VIDA, MUITO OBRIGADA.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bondoso e grandioso Deus pelo dom da vida e por ser minha fonte de coragem sempre.

Aos meus pais Denivaldo e Francisca, e minha irmã Tamara por me apoiarem em cada etapa deste trabalho, sendo os meus guias, minha inspiração.

Ao meu amor, companheiro Vitor por ser muito mais que meu marido, ser meu amigo, ser paciente, e me apoiar em cada dificuldade.

Às minhas Famílias Baldo, Pinheiro da Silva pelo apoio, carinho, amor incondicional na minha caminhada. Em especial à minha 2ª mãe Jane e, ao meu irmão de coração, meu cunhado João, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

À minha segunda casa, família Pereira Pinto, em especial aos meus sogros Ana e Afonso, e também ao Lucas e Fernanda.

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pela oportunidade em trabalharmos juntos, orientação e amizade ao decorrer destes anos. Obrigada pela sua calma, paciência e, acima de tudo sinceridade.

Ao Prof. Dr. James F. Rusling pela prontidão em me aceitar na University of Connecticut para realização do doutorado sanduíche, como também aos pensamentos científicos compartilhados.

Aos meus amigos que são ou foram do LABiE, LABBES e GQA: Camila, Tayane, Elsa, Ademar, Karla, Bene, Jorge, Fred, Cecy, Wallace, Grazi, Carol, Camila Rizzardi, Mari, Diego, Camila Erbereli, Wilson, Tássia, Elson, Índio, Paty Deroco, Lais, Tiago. Agradeço por participarem da minha formação científica com inúmeras discussões científicas e também alguns por ser tornarem meus amigos.

À Camila Proença pela amizade de tantos anos, parceira de trabalho e irmã de coração.

À Tayane Aguiar Freitas que conheci nesta trajetória, a sua sinceridade, amor e compreensão me fortaleceram e me ajudou a estar aqui.

À Dona Ilma, May, Manu por sempre estarem presentes de coração e alma em cada momento.

Val por ser uma mãezona para mim, palavras sábias e sempre prontidão para me ajudar.

À Elsa e Ademar por serem muito mais que parceiros de trabalhos, amigos.

Às minhas queridas companheiras de trabalho e AMIGAS Abby Jones (juntamente com Zack, Fenway, Wally e Missy) e Colleen Krause, por todo incentivo não só

profissional quanto pessoal. Com elas aprendi, a paciência, o zelo e a confiança com uma pessoa “estranha”, e ao mesmo tempo desconhecida (eu). A família de ambas me acolheu muito bem e sou a grata a isso.

Aos professores Profa. Dra. Maria del Pilar Taboada Sotomayor (IQAr/UNESP), Dr. Flavio Makoto Shimizu (CNPEM-Campinas), Profa. Dra. Marystela Ferreira (UFSCar-Sorocaba), Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira de Souza (DQ/UFSCar) por terem aceitado de prontidão participar e contribuir na finalização deste trabalho de doutorado, participando da minha defesa pública da tese.

Ao Hospital de Amor de Barretos pela parceria, em especial ao Matias E. Melendez pela parceria e por ceder as amostras.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho e a Dra Cláudia Razzino pelas discussões científicas e pela prontidão em aceitar participar da minha banca de qualificação.

À Prof. Dra. Caterina Gruenwaldt Cunha Marques Netto e a Dra. Wanessa F. Altei pelas discussões científicas, sugestões sobre o trabalho e pela prontidão em aceitar participar da minha banca de seminário.

Ao Departamento de Gerontologia da UFSCar em especial à Prof. Dra. Márcia Cominetti e a Marina Naves por disponibilizar o laboratório para a realização de algumas medidas.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Química da UFSCar, em especial: Ariane, Cristina e Luciani pela atenção e colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e pela oportunidade de realizar estágio no exterior (PDSE/CAPES), código de financiamento 001.

Aos professores da minha graduação e pós-graduação em Química: mestrado (FCT/UNESP) e doutorado (UFSCar/São Carlos) que fizeram parte da minha caminhada, transmitindo muito mais que conhecimento. Agradecimento especial ao Prof. Dr. Homero Marques Gomes pelo carinho.

E por fim, mas não menos importante, aos meus amigos: Cris, Cá Zambolin, Lionai, Clarezza, Letycia, Tone, Laris, Mamus que mesmo longe fisicamente sempre estavam (ão) prontos para compartilhar, rir, e me ajudar nos momentos de conquistas e dificuldades. A todos que de alguma forma cederam uma parcela de carinho, esforço, incentivo para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Ampére
A	Área eletroativa
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNPs-GSH	Nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona
Ab₁	Anticorpo monoclonal
Ab₂	Anticorpo policlonal
Ab₂-PM-HRP	Bioconjugado formado por partículas magnéticas, anticorpos policlonais e enzima peroxidase
Anti-IgG	Anti-imunoglobulinas
Ag AgCl	Prata/cloreto de prata
Ácido carboxílico	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxi
PEG2000-DSPE	(polietilenoglicol) -2000
BQ	Benzoquinona
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CC	Câncer cervical
CE	Câncer endometrial
COX-2	Ciclooxigenase-2
D	Coeficiente de difusão
DPR	Desvio-padrão relativo
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
E6	Oncoproteína viral E6
EDC	1-etil-3-(3-imetilaminopropil)carbodiimida
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
FeCl₂.4H₂O	Cloreto de ferro (II) tetra-hidratado
FeCl₃.6H₂O	Cloreto de ferro (III) hexahidrato

f	Fento (10^{-15})
GSH	Glutathiona reduzida
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico
HPV	Papilomavírus humano
HRP	Peroxidase de raiz forte (do inglês, <i>Horseradish Peroxidase</i>)
HQ	Hidroquinona
HAuCl₄.xH₂O	Ácido tetracloroaurato (III) hidratado
IMH	Imunohistoquímica
I	Corrente
I_p	Corrente de pico
L	Litro
LPMs	Nanopartículas magnéticas com lipídeos
LNPMs/PLL/Ab₁	Nanopartículas magnéticas modificadas com lipídeos e poli-L-lisina contendo anticorpos monoclonais
mg	Miligrama
mm	Milímetro
min	Minuto
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
MPA	ácido 3-mercaptopropiônico
mol	Unidade de quantidade de matéria
NHS	N-hidroxisuccinimida
NPMs	Nanopartículas magnéticas
NaOH	Hidróxido de sódio
Na₃C₆H₅O₇	Citrato de sódio
n	Nano (10^{-9})

p	Pico (10^{-12})
PDDA	Poli(cloreto de dialildimetilamônio)
PLL	Poli-L-Lisina
p16	Proteína inibidora p16 de quinase dependente de ciclina
PEEK	Poli(éter-éter-cetona) (do inglês, <i>Polyether Ether Ketone</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, Phosphate Buffer Saline)
PM	Partícula magnética
SAM	Monocamadas auto-organizadas (do inglês <i>self-assembled monolayers</i>)
Tp53	Proteína tumoral p53
T20	Tween-20
V	Volt
v	Velocidade de varredura
μ	Micro (10^{-6})
8-ET	8-eletrodos de trabalho

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Representação esquemática dos diferentes tipos de ELISA. _____	9
FIGURA 1.2 – Representação esquemática de um biossensor ⁶² . _____	12
FIGURA 2.1 – Representação esquemática do imunoenensaio proposto. _____	24
FIGURA 2.2 – Representação esquemática da fabricação dos eletrodos pela técnica de serigrafia: confecção de A) oito eletrodos de trabalho e B) do contra-eletrodo e do eletrodo de referência. _____	25
FIGURA 2.3 – Representação esquemática da modificação dos 8-ET pela formação da bicamada de PDDA e AuNPs, ativação dos grupos carboxílicos com EDC/NHS e imobilização dos Ab ₁ para COX-2 e Tp53. _____	28
FIGURA 2.4 – Representação esquemática da montagem da célula eletroquímica microfluídica. _____	29
FIGURA 2.5 – Sistema microfluídico composto por A - bomba de seringa, B – válvula de injeção, C – célula microfluídica e D - multipotenciostato interfaceado a um computador. Tem-se em E e F - zoom da válvula de injeção e célula microfluídica, respectivamente e, G – os componentes integrados desta célula 1. Eletrodo de referência e contra-eletrodo, 2. Eletrodos de trabalho modificados e 3. Cartão adesivo dupla face para formar o canal microfluídico. _____	29
FIGURA 2.6 – Representação esquemática da formação dos bioconjugados Ab ₂ -PM-HRP para A) COX-2 e B) Tp53. _____	30
FIGURA 2.7 – Representação esquemática da etapa de captura dos biomarcadores COX-2 e Tp53. _____	32
FIGURA 2.8 – Representação esquemática da formação do imunoenensaio do tipo sanduíche com a injeção dos biomarcadores capturados pela HRP-PM-Ab ₂ por meio da válvula de injeção cromatográfica, seguido pela interrupção da inserção de fluido no canal microfluídico pausando-se a bomba por 30 minutos e, a formação dos imunoenensaio sanduíches dos eletrodos de 1-4 para COX-2 e 5-8 para Tp53. ____	33
FIGURA 2.9 – Medidas de ângulo de contato realizada com a adição de uma gota de água na superfície dos eletrodos de A) carbono, B) carbono-PDDA e (C) carbono-PDDA-AuNPs. _____	36

- FIGURA 2.10 – Imagens da superfície do eletrodo de A) Carbono e B) Carbono-PDDA-AuNPs utilizando microscópio confocal de varredura a laser. _____ 37
- FIGURA 2.11 – Voltamogramas cíclicos em ácido ferroceno monocarboxílico com concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de A) eletrodo de carbono sem modificação, B) eletrodo modificado com PDDA/AuNPs e C) relação da variação da corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Velocidades de varredura de 10 a 300 mV s^{-1} . _____ 38
- FIGURA 2.12 – Otimização da concentração de Ab_1 utilizada para na imobilização para construção do imunossensor. A resposta de corrente obtida em função da concentração de Ab_1 é apresentada para A) COX-2 e B) Tp53. Para cada concentração é apresentada a corrente do branco e da amostra. Concentração de biomarcador de 10 pg mL^{-1} , tempo de magneto-captura e de formação do sanduíche de 30 min. Solução de detecção contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Os sinais transientes de corrente foram registrados em potencial fixo $-0,2 \text{ V}$. ____ 40
- FIGURA 2.13 – Otimização do tempo de captura dos biomarcadores A) COX-2 e B) Tp53 com Ab_2 -MB-HRP. Foi utilizado $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Ab_1 e 10 pg mL^{-1} dos biomarcadores, $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Os sinais transientes de corrente foram registrados em potencial fixo $-0,2 \text{ V}$. _____ 41
- FIGURA 2.14 – A) Respostas amperométricas para soluções padrões de COX-2 (a-branco; b-h: 10 - $50.000 \text{ fg mL}^{-1}$ e Tp53 (i- branco; j-p: 20 - 10.000). B) Curva analítica para COX-2 (preta) e Tp53 (azul). Os parâmetros utilizados foram 40 minutos de tempo de magneto-captura e 30 minutos para a formação do imunossensor do tipo sanduíche, solução de detecção contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 . _____ 43
- FIGURA 2.15 – Aplicação do imunoenensaio desenvolvido e do método comparativo ELISA para detecção das proteínas COX-2 e Tp53 em seis amostras de pacientes com câncer endometrial (CE) e câncer cervical (CC) na ausência e presença de metástase. _____ 49
- FIGURA 3.1 – Representação esquemática da fabricação dos 8-ET à base de tinta de AuNPs por impressão à jato de tinta. _____ 55

FIGURA 3.2 – Representação esquemática da modificação dos 8-ET à base de AuNPs com monocamadas auto-organizadas com MPA e ancoragem dos Ab₁ anti-p16 e anti-Tp53. _____ 57

FIGURA 3.3 – Sistema microfluídico contendo bomba de seringa (A) com vazão de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$, válvula de injeção (B) conectada a célula microfluídica (C e E - zoom) contendo 8-ETs de ouro confeccionados pela técnica de impressão à jato de tinta (2), eletrodo de referência e contra-eletrodo (3) fabricados pela técnica de serigrafia e um cartão adesivo dupla face (1) contendo o canal microfluídico com dimensões: 30 mm de comprimento, 3,0 mm de largura e 0,3 mm de espessura (F). A célula microfluídica foi interfaceada a um multipotenciostato (D). _____ 58

FIGURA 3.4 – Representação esquemática da etapa de A) magneto-imuno captura, B) formação do imunossensor do tipo sanduíche e C) mecanismo de detecção eletroquímica. _____ 59

FIGURA 3.5 – Resposta de densidade de corrente obtidas em função da concentração de Ab₁ imobilizados sobre a superfície dos 8-ET/SAM é apresentada para A) p16 e B) Tp53 e tempo de magneto-imuno captura entre os bioconjugados Ab₂-MB-HRP e os biomarcadores C) p16 e D) Tp53. Para cada concentração é apresentada a corrente do branco e a amostra. Concentração dos biomarcadores de 50 pg mL^{-1} , tempo de captura e de formação do sanduíche de 30 minutos. Solução de detecção contendo 0,1 mmol L^{-1} de HQ e 1,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 . _____ 61

FIGURA 3.6 – Otimização da vazão da solução carregadora com a injeção de 1,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 e 0,1 mmol L^{-1} de HQ para a detecção de 50 pg mL^{-1} dos biomarcadores COX-2 e Tp53. _____ 62

FIGURA 3.7 – A) Respostas amperométricas para soluções padrões de p16 (a- branco; b-g: 0,83 a 7300 pg mL^{-1}) e p53 (h- branco; i-n: 4,5 a 89 000 pg mL^{-1}). B) Curva analítica para p16 (preta) e Tp53 (azul). Os parâmetros utilizados foram tempos de 20 minutos para a magneto-imuno captura dos biomarcadores e 30 minutos para a formação do imunossensor do tipo sanduíche, solução de detecção contendo 0,1 mmol L^{-1} de HQ e 1,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 , e taxa de vazão de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. _____ 64

FIGURA 3.8 – Imunoensaio eletroquímico e ELISA. Resultados para as proteínas p16 e Tp53 para pacientes com câncer (CE- câncer endometrial; CEM: câncer endometrial com metástase e CC- câncer cervical). _____ 67

- FIGURA 4.1 – Representação esquemática do magneto-imunoensaio proposto. 70
- FIGURA 4.2 – Representação esquemática da construção das células eletroquímicas: etapa 1 e 2 – fixação da máscara negativa de adesivo vinílico, com os desenhos das células, sobre uma folha de poliéster. Etapa 3 e 4 - serigrafia e cura da tinta de carbono por 30 minutos a 90 °C. Etapa 5 e 6 – aplicação da tinta de Ag|AgCl cura por 30 minutos a 60 °C. Etapa 7 – Eletrodos prontos com a retirada do adesivo vinílico e Etapa 8 – Delimitação da área dos eletrodos e contato elétrico com uma máscara de polaseal prensada a quente. 71
- FIGURA 4.3 – Representação esquemática da síntese e modificação das NPMs pelo método de co-precipitação. 73
- FIGURA 4.4 – Representação esquemática do recobrimento das NPMs com lipídeos (LNPMs), as etapas 1 e 2 são realizadas à 40 °C, 10 mmHg por 20 minutos; etapa 5 realizada em 400 rpm a 37 °C. 74
- FIGURA 4.5 – Representação esquemática da A) formação do bioconjugado LNPMs/poli-L-lisina/Ab₁ e da B) captura do biomarcador E6 pelo bioconjugado. 76
- FIGURA 4.6 – Representação esquemática da formação do bioconjugado com AuNPs/ Ab₂. 77
- FIGURA 4.7 – Representação esquemática da A) formação do imunocombinado LNPs-poli-L-lisina- Ab₁/ pE6/ Ab₂-AuNPs e B) mecanismo da etapa de detecção eletroquímica. 78
- FIGURA 4.8 – Caracterização morfológica por microscopia de transmissão eletrônica (MET) em A) das AuNPs em Citrato, B) das NPMs e C) das LNPMs e, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em D) e E) do imunoensaio (LNPMs- poli-L-lisina- Ab₁/ pE6 / Ab₂-AuNPs.) e por EDX em F) do imunoensaio. 80
- FIGURA 4.9 – Voltamogramas cíclicos em meio de ácido ferroceno monocarboxílico com concentração de 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ de A) eletrodo de carbono sem modificação e B) Relação linear entre a corrente de pico anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura, variando-a de 10 a 300 mV s⁻¹. 81

FIGURA 4.10 – Respostas de corrente de pico catódico para a redução das AuNPs frente a diferentes concentrações de E6 utilizando as NPMs sem modificação (esferas pretas), modificadas com lipídeos (esferas vermelhas) e modificadas com lipídeos e poli-L-lisina (esferas azuis) para a imobilização do Ab1 anti-E6. Concentrações de E6 na etapa de magneto-imuno captura de 4,0; 20,0 e 100 fg mL⁻¹. Tempo de condicionamento de 120 s a +1,25 V e varredura em janela de potencial de 1,25 a -0,15 V, usando os seguintes parâmetros: 50 Hz de frequência, potencial de *step* 0,004 V e potencial de amplitude de 0,04 V. _____ 83

FIGURA 4.11 – Otimização da concentração de A) Ab₁ nas NPMs, de 5, 10, 20 e 40 µg mL⁻¹, sendo a concentração fixa de Ab₂ de 3,5 µg mL⁻¹ e 30 min para tempo de captura do analito e formação do imunoensaio; B) da concentração de Ab₂ nas AuNPs, de 0,83; 3,5 e 6,7 µg mL⁻¹, sendo a concentração de Ab₁ fixa em 10 µg mL⁻¹, 30 min tempo de captura e imunoensaio e; respectivamente; e C) do tempo de captura da proteínas E6 pelo Ab₁ presente nas NPMs, de 20, 30, 40 e 50 min, sendo concentração fixa de 10 µg mL⁻¹ de Ab₁, 3,5 µg mL⁻¹ de Ab₂ e 30 minutos de tempo para a formação do imunoensaio. Tempo de condicionamento de 120 s a +1,25 V e varredura em janela de potencial de 1,25 a -0,15 V usando os seguintes parâmetros: 50 Hz de frequência, potencial de *step* 0,004 V e potencial de amplitude de 0,04 V. _____ 85

FIGURA 4.12 – A) Perfis voltamétricos para diferentes concentrações de E6 e B) Curva analítica para a proteína E6. Tempo de condicionamento de 120s a +1,25 V e varredura em janela de potencial de 1,25 a -0,15 V usando os seguintes parâmetros: 50 Hz de frequência, potencial de *step* 0,004 V e potencial de amplitude de 0,04V. 86

FIGURA 4.13 – Detecção de E6 em amostras de soro de pacientes com câncer utilizando o imunoensaio desenvolvido e o ELISA (CE- câncer endometrial e CC- câncer cervical). _____ 88

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – Relação de trabalhos da literatura para detecção dos biomarcadores COX-2 e Tp53 utilizando diferentes métodos e comparação com os resultados obtidos por este trabalho. _____	45
TABELA 2.2 – Resultados obtidos neste trabalho para imunoenaios com detecção individual e multiplexada dos biomarcadores COX-2 e Tp53. _____	48
TABELA 3.1 – Comparação do resultado obtido para a detecção do biomarcador p16 com trabalhos reportados na literatura. _____	65

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS E DE BAIXO CUSTO PARA A DETECÇÃO DE BIOMARCADORES RELACIONADOS AO CÂNCER DE COLO UTERINO E ENDOMETRIAL. O câncer cervical (CC) e câncer endometrial (CE) são neoplasias malignas que acometem as mulheres mundialmente e o diagnóstico precoce destes cânceres ainda são limitados. A incidência destas neoplasias vem aumentando ano a ano e há, portanto, um grande interesse em novas ferramentas para viabilizar um diagnóstico precoce mais preciso, aumentando a eficiência do tratamento e, conseqüentemente diminuindo as taxas de mortalidade. Tendo em vista isso, este trabalho propõe a construção de dispositivos eletroquímicos descartáveis para detecção de biomarcadores proteicos relacionados ao CC e CE por meio de imunossaios do tipo sanduíche utilizando partículas e nanopartículas magnéticas para a captura e separação dos analitos. Estes dispositivos foram fabricados utilizando técnicas de serigrafia e de impressão a jato de tinta. O primeiro trabalho desenvolvido compreendeu a construção de eletrodos por serigrafia, compondo uma célula microfluídica que foi constituída por um arranjo de 8 eletrodos de trabalho conectados com um eletrodo de pseudo-referência e um contra eletrodo. O dispositivo foi aplicado na detecção multiplexada dos biomarcadores ciclooxigenase-2 (COX-2) e proteína tumoral Tp53 (Tp53). Para isto, anticorpos monoclonais (Ab_1) foram imobilizados na superfície dos eletrodos de trabalho modificado previamente com uma bicamada formada de poli(cloreto de dialildimetilamônio) e nanopartículas de ouro (AuNPs) decoradas com glutiona. Partículas magnéticas (PMs) modificadas com anticorpos policlonais (Ab_2) e enzima peroxidase (HRP) como marcador eletroquímico foram utilizadas para a captura e separação dos biomarcadores em amostras de soro de pacientes com CC e CE e injetadas no dispositivo microfluídico para a detecção via imunossai do tipo sanduíche. Foram obtidos baixos limites de detecção (LD) de $0,23 \text{ fg mL}^{-1}$ e $0,18 \text{ fg mL}^{-1}$ para COX-2 e Tp53, respectivamente, utilizando a técnica de amperometria. O segundo trabalho consistiu na construção de dispositivo microfluídico com 8 eletrodos à base de ouro utilizando uma impressora à jato de tinta e aplicados na detecção dos biomarcadores proteína inibidora p16 de quinase dependente de ciclina (p16) e Tp53. Este dispositivo compreendeu o uso de monocamadas auto-organizadas para ancoramento do Ab_1 e PMs decoradas com Ab_2 e HRP para captura e separação. A faixa de concentração detectada por este imunossensor foi ampla abrangendo a escala de pg a ng mL^{-1} , com LD ultrabaixos de $0,08 \text{ pg mL}^{-1}$ para o p16 e $0,04 \text{ pg mL}^{-1}$ para o Tp53. O terceiro trabalho consistiu na detecção da oncoproteína E6 associada ao papilomavírus humano (HPV) utilizando um magneto-imunossai eletroquímico. Neste caso, nanopartículas magnéticas contendo lipídeos (LNPs) foram sintetizadas e modificadas com Ab_1 anti-E6. Após a captura e separação do biomarcador foi adicionado AuNPs decoradas com Ab_2 e o bioconjugado obtido foi capturado na superfície dos eletrodos utilizando um ímã posicionado externamente sob o eletrodo de trabalho. A detecção de E6 foi realizada pela resposta eletroquímica do ouro presente nas AuNPs em ácido clorídrico por voltametria de onda quadrada. O imunossai magnético apresentou resposta linear para E6 entre 4 fg mL^{-1} e $2,5 \text{ pg mL}^{-1}$ com LD de $0,4 \text{ fg mL}^{-1}$. Os três imunossaios desenvolvidos foram aplicados na detecção dos biomarcadores em amostras de pacientes com CC e CE e apresentaram excelente concordância quando comparadas com os resultados obtidos por ensai de imunoabsorção enzimática (ELISA). Os métodos propostos são ferramentas promissoras para triagem, diagnóstico precoce, tratamento terapêutico e estadiamento da doença em análises clínicas de CC e CE, com vantagens sobre o método de ELISA, incluindo a rapidez, reprodutibilidade, baixo custo, baixo limite de detecção e baixo consumo de reagentes e amostras.

Palavras-chave: câncer, câncer cervical, câncer endometrial, diagnóstico precoce, imunossaios eletroquímicos, microfluídica, biomarcadores proteicos, COX-2, Tp53, p16, E6.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF LOW-COST AND DISPOSABLE DEVICES FOR THE DETECTION OF BIOMARKERS RELATED TO CERVICAL AND ENDOMETRIAL CANCER. Cervical cancer (CC) and endometrial cancer (EC) are malignant neoplasms that affect women worldwide and the early diagnosis of these cancers is still limited. The incidence of these malignancies has been increasing year by year and, therefore, there is a great interest in new tools to enable a more accurate early diagnosis, increasing treatment efficiency and, consequently, reducing mortality rates. In this view, this work proposes the construction of disposable electrochemical devices for detection of CC and EC-related protein biomarkers by sandwich-type immunoassays using magnetic particles and nanoparticles for the capture and separation of analytes. These devices were manufactured using screen printing and inkjet printing techniques. The first work developed comprised the construction of screen-printing electrodes, composing a microfluidic cell that was constituted by an arrangement of 8 working electrodes connected with a pseudo-reference electrode and a counter electrode. The device was applied in the multiplexed detection of cyclooxygenase-2 (COX-2) and tumor protein Tp53 (Tp53) biomarkers. These devices were manufactured using screen printing and inkjet printing techniques. The first work developed comprised the construction of screen-printing electrodes, composing a microfluidic cell that was constituted by an arrangement of 8 working electrodes connected with a pseudo-reference electrode and a counter electrode. The device was applied in the multiplexed detection of cyclooxygenase-2 (COX-2) and tumor protein Tp53 (Tp53) biomarkers. For this, monoclonal antibodies (Ab_1) were anchored on the surface of previously modified working electrodes with a bilayer formed poly (diallyldimethylammonium chloride) and gold nanoparticles (AuNPs) decorated with glutathione. Magnetic particles (PMs) modified with polyclonal antibodies (Ab_2) and enzyme peroxidase (HRP) as electrochemical marker were used to capture and separate the biomarkers in serum samples from patients with CC and CE and injected into the microfluidic device for detection by immunoassay of the sandwich type. Low detection limits (LD) of 0.23 fg mL^{-1} and 0.18 fg mL^{-1} were obtained for COX-2 and Tp53, respectively. The second work consisted in the construction of a microfluidic device with 8 gold-based electrodes using an inkjet printer and applied in the detection of the biomarkers cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (p16) and Tp53. This device comprised the use of self-assembled monolayers for anchoring the Ab_1 and PMs decorated with Ab_2 and HRP for capture and separation. The concentration range detected by this immunosensor was broad-ranging from pg to ng mL^{-1} , with ultralow LD of 0.08 pg mL^{-1} for p16 and 0.04 pg mL^{-1} for Tp53. The third work consisted of the detection of the E6 oncoprotein associated with the human papillomavirus (HPV) using an electrochemical magneto-immunoassay. In this case, lipid-containing magnetic nanoparticles (LNPMs) were synthesized and modified with anti-E6 Ab_1 . After capture and separation of the biomarker, AuNPs decorated with Ab_2 were added and the obtained immunoassay was captured on the surface of the electrode using a magnet positioned externally under the working electrodes. Detection of E6 was performed by the electrochemical gold response of AuNPs in hydrochloric acid by square wave voltammetry. The magnetic immunoassay presented a linear response for E6 between 4 pg mL^{-1} and 2.5 pg mL^{-1} with LD of 0.4 pg mL^{-1} . The three immunoassays developed were applied in the detection of biomarkers in patient samples with CC and EC and presented excellent agreement when compared with the results obtained by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The methods proposed are promising tools for screening, early diagnosis, therapy management, and disease staging in clinical analyzes. of CC and EC, with advantages over the ELISA method, including speed, reproducibility, low cost, low detection limit, and low reagent and sample consumption.

Keywords: cancer, cervical cancer, endometrial cancer, early diagnosis, electrochemical immunoassays, microfluidic, protein biomarkers, COX-2, Tp53, p16, E6.

SUMÁRIO

CAPÍTULO – 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 - CÂNCER	2
1.1.1 - Câncer de colo uterino e câncer endometrial	2
1.1.2 - Diagnóstico e Rastreamento	3
1.2 - BIOMARCADORES	5
1.2.1 - Ciclooxigenase-2	5
1.2.2 - Proteína tumoral p53	6
1.2.3 - Proteína inibidora p16 de quinase dependente de ciclina (p16)	6
1.2.4 - Oncoproteína viral E6 (E6)	7
1.3 - TÉCNICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES	8
1.3.1 - Imunohistoquímica	8
1.3.2 - Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA- do inglês “ <i>Enzyme- Linked Immunosorbent Assay</i> ”)	9
1.3.3 - Técnicas eletroquímicas	11
1.4 - ESTRATÉGIAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE SINAL ANALÍTICO	13
1.4.1 - Nanopartículas de ouro	13
1.4.2 - Monocamadas auto-organizadas	14
1.4.3 - Partículas magnéticas	15
1.4.4 - Lipídeos	16
1.5 - ELETRODOS IMPRESSOS	17
1.5.1 - Técnica de serigrafia	18
1.5.2 - Impressão à jato de tinta	19
1.6 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	19
CAPÍTULO – 2 DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE TP53 E COX-2 EM PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL E ENDOMETRIAL	21
2.1 - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	22
2.2 - PARTE EXPERIMENTAL	23

2.2.1 - Fabricação de eletrodos descartáveis pela técnica de serigrafia	24
2.2.2 - Modificação dos eletrodos de trabalho (8-ET)	26
2.2.3 - Modificação das partículas magnéticas com o anticorpo policlonal e enzima <i>horseradish</i> peroxidase	30
2.2.4 - Etapa de captura imunomagnética das proteínas COX-2 e Tp53 pelo bioconjugado Ab ₂ -PM-HRP	32
2.2.5 - Detecção eletroquímica dos biomarcadores COX-2 e Tp53	33
2.2.6- Método comparativo ELISA	34
2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
2.3.1 - Caracterização morfológica e eletroquímica dos eletrodos de trabalho	35
2.3.2 - Otimizações dos parâmetros experimentais para a detecção dos biomarcadores propostos	39
2.3.4 - Curva de calibração para os biomarcadores estudados	42
2.3.5 - Aplicação do imunoenensaio multiplexado para detecção dos biomarcadores COX-2 e Tp53 em amostras de soro de pacientes com CC e CE	49
2.4 - CONCLUSÕES	50
CAPÍTULO – 3 DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOENSAIO MULTIPLEXADO PARA DETERMINAÇÃO DOS BIOMARCADORES P16 E TP53 EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL E ENDOMETRIAL	52
3.1 - MATERIAIS UTILIZADOS	53
3.2 - PARTE EXPERIMENTAL	53
3.2.2 - Fabricação dos eletrodos descartáveis	53
3.2.2 - Modificação do arranjo de 8-ET à base de ouro com monocamadas auto-organizadas e Ab ₁	56
3.2.3 - Modificação das PMs com Ab ₂ e HRP, captura e detecção eletroquímica dos biomarcadores p16 e Tp53	58
3.2.4 - Método comparativo ELISA	59
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
3.3.1 - Otimização dos parâmetros experimentais	60

3.3.2 - Curva de calibração para os biomarcadores p16 e Tp53	63
3.3.3 - Aplicação do imunoenensaio multiplexado para p16 e Tp53 em amostras de pacientes com CC e CE	66
3.4 CONCLUSÕES	68
CAPÍTULO – 4 MAGNETO-IMUNOENSAIOS ELETROQUÍMICOS COM A UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPMs) REVESTIDAS COM LIPÍDEOS E POLI-L-LISINA PARA DETECÇÃO DA ONCOPROTEÍNA E6	69
4.1 - MATERIAIS UTILIZADOS E EQUIPAMENTOS	71
4.2 - PARTE EXPERIMENTAL	71
4.2.1 - Fabricação dos eletrodos	71
4.2.2 - Síntese das nanopartículas magnéticas	72
4.2.3 - Recobrimento das NPMs com lipídeos	73
4.2.4 - Modificação das LNPMs com anticorpos monoclonais (Ab _{1E6}) e captura do biomarcador E6	74
4.2.5 - Síntese das nanopartículas de ouro funcionalizadas com citrato	76
4.2.6 Modificação das AuNPs com anticorpos policlonais	77
4.2.7 - Imunoenensaio sanduíche e etapa de detecção eletroquímica	77
4.2.8 Método comparativo ELISA	79
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.3.1 - Caracterização morfológica	79
4.3.2 - Caracterização eletroquímica	81
4.3.3 - Diferentes modificações de NPMs para a formação do magneto-imunoenensaio eletroquímico	82
4.3.4 - Otimização dos parâmetros experimentais para o imunoenensaio	83
4.3.5 - Curva de calibração para o E6	85
4.3.6 - Aplicação do magneto-imunoenensaio em amostras de pacientes	87
4.4 - CONCLUSÕES	89
CAPÍTULO – 5 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	90
CAPÍTULO – 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

CAPÍTULO - 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 - CÂNCER

Câncer é a denominação de um conjunto de mais de 100 doenças, caracterizadas pelo crescimento não sistemático das células, que se propagam para outras regiões do organismo, por meio do sangue e/ou de vasos linfáticos. A formação de tumores malignos deve-se à divisão rápida e aleatória, que é decorrente de erros genéticos provenientes da etapa de divisão celular, a mitose. A metástase é conhecida como a dispersão das células tumorais, e, a colonização é o estabelecimento destas células em novos tecidos e órgãos, ambas são responsáveis pela formação do câncer metastático. O câncer também é conhecido como cancro ou neoplasia maligna ¹.

Segundo a Organização Mundial da Saúde e Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), esta doença é a segunda causa de morte mundialmente, sendo que para o biênio 2018/2019 estima-se cerca de 600 mil novos casos por ano no Brasil e um aumento de até 70% é esperado para o ano de 2038 ².

1.1.1 - Câncer de colo uterino e câncer endometrial

Dentre os tipos de cânceres ginecológicos, os de maior ocorrência são o de colo uterino também conhecido como câncer cervical (CC) e endometrial (CE), sendo que o primeiro se localiza na parte da cérvix, enquanto que o outro na camada interna do útero. Apesar do avanço na realização do diagnóstico destes tipos de câncer no Brasil, quando comparado com a década de 1990, na qual 70% dos pacientes eram diagnosticados em estágio metastático, atualmente ainda há uma grande deficiência no diagnóstico precoce destes tipos de cânceres. Entre o número de casos diagnosticados no Brasil, o CC ocupa o quarto lugar em número de ocorrências, enquanto o CE ocupa o décimo quarto com 44% dos casos diagnosticados no início da doença ³.

O câncer cervical, é o oitavo câncer de maior incidência no mundo e dentre o sexo feminino se caracteriza como o quarto. Para os anos 2018/2019 estão previstos cerca de 500.000 novos casos por ano no âmbito mundial. Os países com maior incidência estão localizados na África e países em desenvolvimento como África do Sul, Brasil, Argentina, entre outros. Este cenário pode ser reflexo de uma defasagem ao acesso de ferramentas para diagnóstico como a triagem citológica e exames sofisticados de imagem nestas regiões. A maior incidência deste tipo de câncer ocorre

em indivíduos na faixa etária de 45 a 50 anos, e no Brasil está entre as enfermidades que mais ocasionam óbitos entre as mulheres ^{4,5}.

Cerca de 98% dos casos de CC estão associados ao papilomavírus humano (HPV) e outros fatores como: tabagismo, vida sexual ativa, precoce e com múltiplos parceiros, multiparidade e até mesmo o uso de medicamentos (como o dietilestilbestrol). Vale ressaltar que a infecção pelo HPV não é indicativo da ocorrência deste tipo de câncer, visto que a maioria das mulheres que são infectadas por este vírus não desenvolvem o CC ^{6,7}.

Outro câncer que acomete a população feminina é o câncer endometrial, apresentando-se como o oitavo de maior em incidência nas mulheres mundialmente, e o décimo quinto de maior incidência dentre todos os tipos de cânceres. Para 2018 estimaram-se cerca de 318.000 novos casos deste câncer no mundo ⁸. A alta incidência deste câncer não apresenta fatores específicos, mas apresentam fortes evidências de maior proporção quando relacionados a fatores externos como: sobrepeso, carga glicêmica, sedentarismo e menopausa. As taxas de diagnóstico do CE são extremamente baixas em estágios iniciais, sendo assim muitos casos são identificados em estágios tardios, inviabilizando um tratamento terapêutico efetivo. Vale ressaltar também que há dificuldade na preditiva de incidência deste câncer, uma vez que não há exames clínicos efetivos para diagnosticar a recorrência do câncer de forma precisa sendo, aproximadamente 90% dos casos são esporádicos e 10% são relacionados com hereditariedade ⁸.

1.1.2 - Diagnóstico e Rastreamento

O rastreamento do câncer cervical na rotina médica é realizado pelos testes de Papanicolau e HPV. O Papanicolau é caracterizado por um exame físico realizado uma vez ao ano pela coleta do material do colo do útero seguido pela análise citopatológica em mulheres que começaram sua vida sexual ou mulheres acima de 25 anos. Este teste detecta possíveis alterações nas células que podem estar infectadas pelo vírus HPV, porém não consegue identificar a presença do vírus ⁹. Os resultados do Papanicolau são descritos de acordo com a classe de inflamação sendo de I a V. Na classe I não há alterações no material coletado. Já na classe II, são verificadas inflamações com alterações benignas, não sendo necessário a realização de um outro tipo de exame. A classe III requer uma atenção mais

minuciosa uma vez que pode indicar a presença de algum tipo do vírus HPV, e pode estar ocasionando o surgimento de células pré-carcinogênicas. O início do CC está relacionado à classe de inflamação IV, com o surgimento de lesão intraepitelial escamosa de alto grau e, adenocarcinoma localizado no colo uterino. A classe V confirma a presença do câncer cervical em estágios mais avançados, sendo necessários tratamentos e em alguns casos cirurgia para sua erradicação ¹⁰.

Já o teste de HPV é recomendado pelos médicos quando o teste de Papanicolau apresentar anormalidades como células escamosas atípicas de significado indeterminado e em mulheres com 30 anos ou mais. O teste não é específico para a detecção do CC, mas sim para a presença do vírus HPV. As infecções causadas pelo tipo 16 ou 18 deste vírus aumentam o risco para CC, entretanto a maioria das infecções desaparece dentro de um a dois anos. Este teste pode estar associado a resultados falso-positivos, ocasionando a necessidade de testes de colposcopia e biópsia, como também a falso-negativos dificultando um acompanhamento mais apropriado para o diagnóstico do câncer ^{11,12}.

A maioria dos casos investigativos frente ao CE está relacionada às mulheres que apresentam sintomas como sangramento vaginal entre as menstruações ou após a menopausa. Porém, em alguns casos o CE pode atingir estágios avançados antes mesmo do surgimento dos sintomas. O rastreamento deste câncer é realizado por exame pélvico e ultrassons pélvicos e/ ou transvaginal. Diferente do CC, não há uma ferramenta de prevenção e indicativo deste câncer com testes anualmente executados. O diagnóstico do CE é confirmado pela análise de células do endométrio por meio de biópsias, histeroscopia e dilatação e curetagem ¹³⁻¹⁵.

A detecção precoce viabiliza um tratamento mais eficaz para a erradicação total do câncer. Muitas investigações de como melhorar esta detecção vêm despertando interesse na busca de novas ferramentas, novas técnicas e consequentemente novas estratégias para viabilizar o diagnóstico precoce e tratamento adequado dos cânceres ginecológicos. Neste sentido, o estudo de moléculas alvos, chamadas de biomarcadores, vem despertando grande interesse tanto na área de pesquisa, visto que podem levar ao desenvolvimento de ferramentas promissoras para diagnóstico precoce dos cânceres cervical e endometrial, como também em uma avaliação terapêutica mais precisa dos mesmos ^{16,17}.

1.2 - BIOMARCADORES

A definição de biomarcador está relacionada a um indicador mensurável: uma substância, uma estrutura ou um processo, em um organismo ou fluídos biológicos, que está diretamente relacionado à influência e preditiva de processos biológicos normais, patológicos e/ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica ¹⁸. Os biomarcadores ideais são aqueles que além de possibilitar o diagnóstico precoce da doença, permitem estabelecer a extensão da mesma, monitorar a resposta terapêutica, e têm tempo de meia vida curto, viabilizando o acompanhamento temporário das mudanças do tumor. Os eventos moleculares envolvidos com as células malignas geralmente são mediados por proteínas, por isso se torna imprescindível estudar a presença e função destas macromoléculas, para estabelecer melhores procedimentos de rastreamento da doença, novas estratégias terapêuticas e melhorar a sobrevida do paciente ^{17,19,20}.

1.2.1 - Ciclooxigenase-2

A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima que catalisa ácido araquidônico em prostaglandinas, que são responsáveis pela proliferação celular. A atividade da enzima COX-2 é estável e supra regulada e, pode ser aumentada frente a uma variedade de substâncias inflamatórias. A COX-2 está intimamente ligada a processos inflamatórios, crescimento e diferenciação celular, crescimento de células tumorais e inibição de apoptose celular. O crescimento das células tumorais provoca uma aumento da expressão da proteína COX-2 ²¹⁻²³. Portanto, pode-se relacionar a superexpressão da proteína COX-2 ao surgimento de células malignas tanto no CC pela infecção pelo HPV, quanto no CE ²⁴⁻²⁶.

Hoellen e colaboradores sugerem que a expressão aumentada desta proteína está associada com a progressão do tumor em câncer cervical ²⁷. Telliez *et al.* descreveram o potencial farmacológico do uso de agentes quimioterápicos na diminuição da expressão da COX-2 em estratégias terapêuticas e, conseqüentemente o uso de uma quimioterapia adequada para evitar a proliferação celular, estágios metastáticos e, propiciar em alguns casos a erradicação do câncer ²⁸.

1.2.2 - Proteína tumoral p53

A proteína tumoral p53 (Tp53) é traduzida pelo gene p53, que é considerado “guardião do genoma” e está diretamente relacionada aos processos de carcinogênese. A proteína Tp53 foi descrita pela primeira vez no ano de 1979, e vem sendo associada a diferentes tipos de vírus incluindo os vírus SV40, E1B e também aos que estão diretamente ligados ao câncer cervical, HPV16 e HP18²⁹. Esta proteína está diretamente relacionada com a saúde celular, a integridade de seus cromossomos e a execução de diferentes fases do ciclo celular regular³⁰.

O gene p53 é um gene supressor de tumor sendo capaz de suprimir o crescimento de células neoplásicas, impedindo muitas vezes o processo de metástase induzida pelos oncogenes^{30,31}. Este gene está localizado no cromossomo 17 e é responsável pela codificação da fosfoproteína nuclear p53, que apresenta 375 aminoácidos. Na presença de células malignas, ocorre uma mutação desta proteína, que está diretamente ligada a um bloqueio reversível nas fases G1 ou S do ciclo celular, chamado de ponto de checagem³². Este bloqueio celular resulta em um processo irreversível de morte celular individualizada (apoptose celular) ou permite reparo no genoma, porém estes danos no DNA podem ser permanentes, uma vez que ao não sofrer o processo de apoptose, podem iniciar um clone maligno³³. Como mencionado anteriormente, o câncer de colo uterino está relacionado com a infecção pelo vírus HPV. A presença das proteínas oncogênicas, principalmente a proteína E6, promove a degradação da proteína p53, conseqüentemente ocorre uma diminuição da expressão desta proteína pelo gene³⁴.

1.2.3 - Proteína inibidora p16 de quinase dependente de ciclina (p16)

A proteína p16 é codificada pelo gene supressor tumoral LNK4a. Esta proteína está relacionada com o controle do ciclo celular, principalmente com o crescimento celular (fase G1) e a duplicação do DNA (fase S), levando assim células anormais a senescência, e conseqüentemente inibe a transição da fase G a fase S³⁵. A oncogênese está relacionada à mutação, deleção e metilação do gene, que leva à alteração estrutural e funcional da proteína e, conseqüentemente a proliferação celular anormal³⁶.

Yemelyanova e colaboradores evidenciaram que a expressão da proteína p16 está relacionada à diferenciação de lesões endocervicais e lesões endometriais em aplicação clínica pela técnica de imunohistoquímica, uma vez que lesões no colo uterino apresentaram positividade difusa desta proteína em contrapartida as lesões endometriais ³⁷, porém para uma diferenciação mais precisa necessita-se da associação deste biomarcador com outros, como por exemplo a p53 e proteínas relacionadas diretamente com o HPV. Engelsen *et al.* avaliaram a expressão desta proteína em biópsias pré-operatórias, e observaram que a mesma estava presente em 25% dos casos ³⁸.

Apesar de estágios mais agressivos estarem relacionados com a expressão diminuída desta proteína, demonstrando a falha no ciclo celular, em alguns casos pode haver a expressão aumentada da mesma, indicando que a proteína não está relacionada diretamente ao surgimento do processo carcinogênico ³⁹.

1.2.4 - Oncoproteína viral E6 (E6)

A proteína E6 está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma das células com peso molecular de 18kDa, contendo 158 resíduos de aminoácidos e está diretamente relacionada à amplificação do genoma viral. E6 é considerada uma proteína multifuncional e influencia diretamente o ciclo celular, uma vez que tem a capacidade de interagir com proteínas que intermediam a proliferação celular. A E6 atua também nos receptores de fatores de crescimento, inibe apoptose e promove processo de angiogênese ⁴⁰. Esta proteína é considerada viral e está diretamente ligada a infecção pelo vírus HPV 16 e à degradação da Tp53, ocasionando um aumento do crescimento das células tumorais, devido à alteração no ciclo celular, seguido pela diferenciação celular e, conseqüentemente o acúmulo de defeitos na mitose, instabilidade genômica e, por conseguinte manutenção do fenótipo maligno ^{41,42}. Apesar deste comportamento, a proteína E6 também possui atividades oncogênicas independentes da Tp53 ⁴³.

1.3 - TÉCNICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES

A caracterização e quantificação destes biomarcadores são úteis também para o estudo clínico de pacientes com câncer, por meio da resposta terapêutica, detecção de recidivas e no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento ¹⁹. Os métodos convencionais utilizados em rotinas clínicas mais frequentes para a detecção de biomarcadores são os métodos bioquímicos como o ensaio de imunoabsorção enzimática ou métodos imunohistoquímicos ^{16,44-46}.

1.3.1 - Imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IMH) é uma das técnicas mais frequentemente utilizadas em laboratórios para análise de tecidos, em busca de características moleculares utilizando um microscópio óptico. Esta técnica é muito utilizada em análises qualitativas que tem como objetivo verificar grau de doenças inflamatórias e de neoplasias. Ao analisar o formato celular, em alguns casos, é utilizada na predição e prognósticos do câncer ⁴⁷.

A análise IMH é efetuada em três etapas sendo a primeira pré-analítica ou etapa de preparação da amostra, que consiste na fixação de secções finas de tecido, cerca de 4,0 µm, sobre uma lâmina de vidro recoberta por proteínas por meio de métodos químicos com o uso de formalina ou parafina, como também por uma etapa de congelamento das amostras. Esta etapa assegura a arquitetura original do tecido, viabilizando assim localizar os antígenos nos componentes histológicos e celulares. A segunda etapa consiste na recuperação antigênica de epítomos, na qual as amostras de tecidos estão expostas a um anticorpo primário contra o biomarcador de interesse. A terceira etapa consiste na etapa de detecção, que pode ser amplificada com a adição de um anticorpo secundário contra o anticorpo primário, seguido pela adição de um reagente cromogênio ou um polímero para amplificação de sinal. As amostras são coradas e, a detecção pode ser mensurada por detecção colorimétrica ou por fluorescência, e a quantidade de proteínas podem ser realizadas de forma semi-quantitativa ^{48,49}.

Esta técnica é utilizada para análise de tecidos provenientes de biópsias, peças cirúrgicas e de necropsias, bem como de esfregaços citopatológicos provenientes do exame do Papanicolau. Na área de oncologia, este teste é usado

para definir o melhor tratamento e evolução do câncer, como também auxiliar na diferenciação de um carcinoma, linfoma, melanoma ou sarcoma ⁴⁸. No entanto, requer a presença do tumor o que inviabiliza o teste para diagnóstico precoce.

Os resultados provenientes deste tipo de análise podem sofrer interferências de muitas variáveis como a má fixação da amostra de tecido, processos de recuperação de antígenos, tipo de anticorpo a ser utilizado, bem como a diluição apropriada dos mesmos. A padronização na interpretação dos dados é imprescindível para se obter diagnósticos confiáveis ⁴⁹.

1.3.2 - Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA- do inglês “*Enzyme- Linked Immunosorbent Assay*”)

Tanto em análises clínicas de rotina quanto em trabalhos de pesquisa, o ensaio de imunoabsorção enzimática continua sendo o padrão “ouro” na quantificação de proteínas. Esta técnica é descrita por reações entre antígeno-anticorpo realizados sobre uma microplaca e a detecção é realizada espectrofotometricamente decorrente das reações enzimáticas, podendo ser utilizado na detecção do analito alvo não apenas em lisados celulares, como também em fluídos biológicos como: soro, saliva, e plasma ⁴⁴.

Os testes ELISA podem ser de diferentes tipos, podendo ser direto ou indireto, conforme figura 1.1.

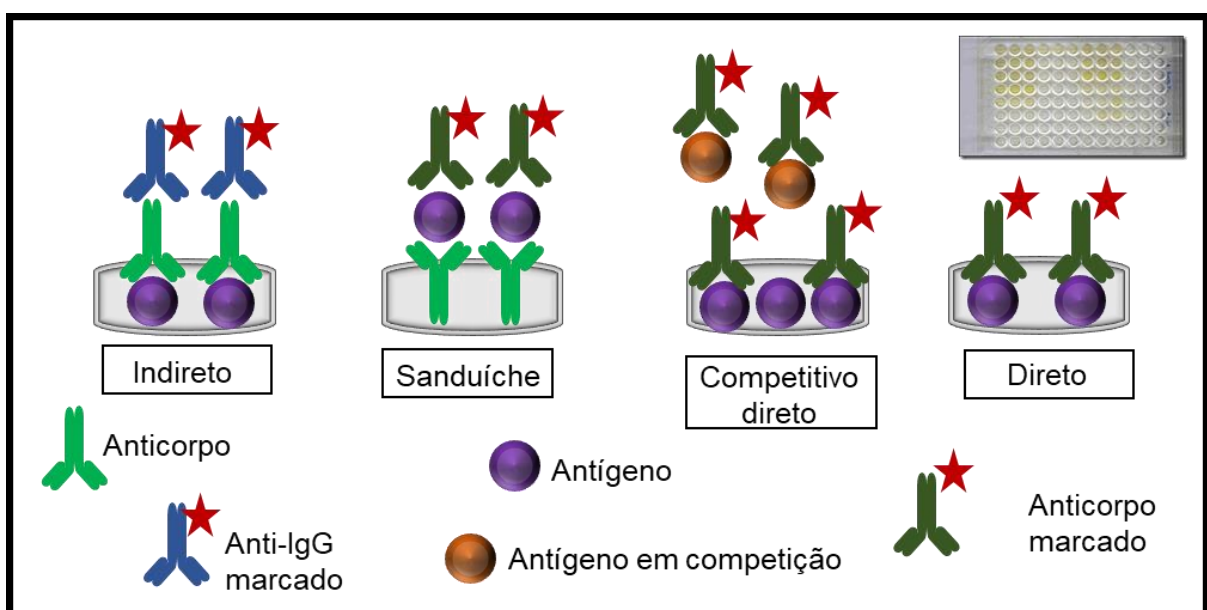


FIGURA 1.1 – Representação esquemática dos diferentes tipos de ELISA.

No ELISA indireto, um antígeno com concentração conhecida é aderido à placa seguida pela adição da amostra. Na presença do anticorpo específico para o antígeno na amostra, forma-se o complexo antígeno-anticorpo, seguida pela adição de um anticorpo secundário marcado, estes anticorpos são anti-imunoglobulinas (anti-IgG) marcadas com enzimas e devem ser reativos ao anticorpo primário garantindo a eficiência na detecção, em muitos casos são anti-IgG conjugados com enzima peroxidase. Este tipo de imunoenensaio também pode ser configurado com o antígeno e amostras sendo adsorvidas na placa, cujas concentrações são desconhecidas, quando o analito alvo de interesse é reconhecido por anticorpos, seguida da adição de anticorpos primários específicos e anti-IgG marcado, ambos anticorpos com concentrações conhecidas. Outro método é o ELISA indireto do tipo sanduíche, o anticorpo adsorvido na placa é colocado em contato com a amostra, ligando-se o antígeno de interesse, seguido pela adição do anticorpo secundário marcado específico para o analito alvo. Nestes estudos os sinais mensurados são proporcionais às concentrações das moléculas alvo de interesse ⁵⁰.

No ELISA direto, concentrações conhecidas do antígeno e amostras são adsorvidas na placa, seguida pela adição de anticorpos específicos e marcados. Outro método é o ELISA competitivo direto, no qual o analito alvo aparece em concentrações variáveis na mistura com um anticorpo, cuja concentração é conhecida e limitada, e compete com uma concentração conhecida do antígeno fixo na placa. Este ELISA pode ser configurado na forma indireta, sendo que concentrações variáveis e conhecidas do antígeno é aderida sobre a placa, e a adição de uma solução contendo uma concentração fixa anticorpo e uma concentração conhecida do antígeno irá competir com aqueles previamente fixados na placa, seguido pela adição do anti-IgG marcado. A quantidade de antígeno livre será inversamente proporcional à medida colorimétrica nestes tipos de ensaios. Ensaios competitivos são recomendados para analitos cuja massa molecular é pequena ou que não possua mais do que um epítipo ^{50,51}.

Em ensaios cujo marcador é a enzima peroxidase, por exemplo, utiliza-se como substrato o peróxido de hidrogênio e algum reagente cromógeno. A coloração característica irá ocorrer nos poços que apresentam a reação antígeno-anticorpo, e será variável dependendo do substrato e ensaio utilizado ⁵².

O ELISA apresenta algumas limitações inerentes, incluindo a necessidade de um volume de amostras e reagentes relativamente grandes, etapas longas de

incubação e de lavagens, tornando a técnica dispendiosa e morosa ⁵³. Em virtude disso, abordagens alternativas para superar estas dificuldades vem sendo desenvolvidas a fim de assegurar análises mais simples, rápidas, confiáveis e de baixo custo para a determinação de biomarcadores em diferentes fluídos biológicos ⁶.

1.3.3 - Técnicas eletroquímicas

A fim de contornar as limitações apresentadas pelos métodos convencionais mais comumente utilizados, como IMH e ELISA, o uso de técnicas eletroquímicas têm se tornado atrativas para a detecção de biomarcadores. Estas técnicas são compatíveis com tecnologias de miniaturização e microfabricação, e o sinal eletroquímico possibilita quantificar o analito em solução com uso de instrumentação simples e de baixo custo ^{54,55}. O monitoramento da interação antígeno e anticorpo tem sido amplamente estudado utilizando técnicas eletroquímicas, cujo intuito é o diagnóstico precoce de doenças de forma rápida, simples e com baixo custo ⁵⁶. Outro importante atrativo desta técnica é a possibilidade da determinação do analito ser realizada *in situ* e em tempo real ⁵⁷.

A construção de biossensores eletroquímicos para biomarcadores proteicos torna-se uma ferramenta poderosa para detecção sequencial e/ou simultânea destas macromoléculas, viabilizando um diagnóstico mais preciso e rápido, uma vez que não existem biomarcadores específicos para CC e CE ^{55,58}.

1.3.3.1 - Biossensores

Biossensores são definidos como dispositivos que utilizam reações biológicas específicas para detecção da molécula alvo. Para isto, o componente biológico é imobilizado sobre a superfície de um transdutor que interagirá especificamente com o analito de interesse, em um processo de biorreconhecimento, transformando o sinal biológico em sinal mensurável, que no caso de um transdutor eletroquímico seria oriundo de uma variação de corrente, de potencial, de carga, de resistência a transferência de carga ou de capacitância ⁵⁹. O uso de um componente biológico confere ao dispositivo alta seletividade, devido à possibilidade de assegurar interação específica com o analito alvo, para a detecção de biomarcadores ⁶⁰⁻⁶². A figura 1.2 ilustra esquematicamente os componentes presentes em um biossensor.

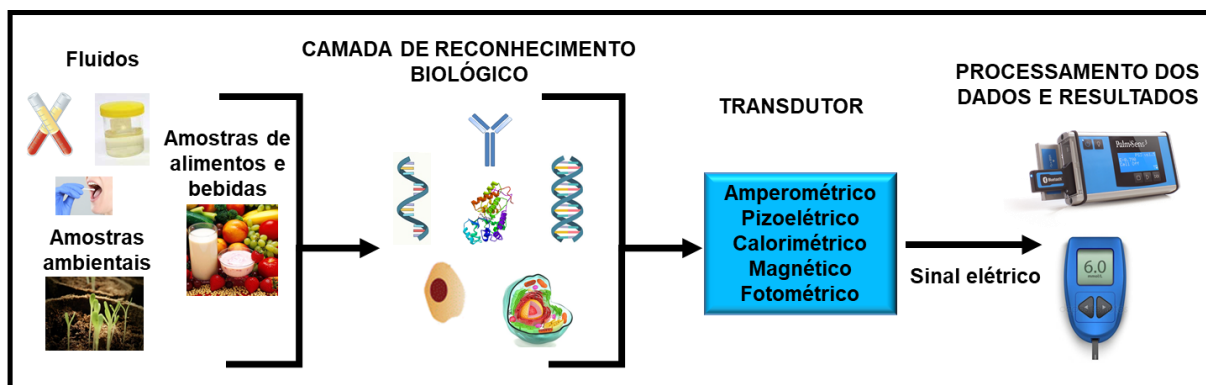


FIGURA 1.2 – Representação esquemática de um biossensor ⁶².

A figura 1.2 ilustra as diferentes amostras que podem ser analisadas e reconhecidas pelo componente biológico que inclui os analitos: ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA), enzimas, anticorpos, células, entre outros, sendo que o sinal biológico é convertido pelo transdutor em sinal elétrico, no qual o resultado é processado por dispositivos eletrônicos, podendo ser utilizadas técnicas de amperometria, voltametria, etc. ⁶².

Dentre a classe dos biossensores, pode-se destacar os imunossensores que se baseiam na interação específica entre antígenos e anticorpos. O primeiro imunossensor apresentado na literatura surgiu em 1979, com estudos realizados por Aizawa na determinação do hormônio de crescimento, empregando eletrodo de oxigênio ^{63,64}. Um imunossensor eletroquímico é caracterizado pela imobilização do antígeno ou anticorpo sobre a superfície do eletrodo. Uma vez que reação é altamente específica com a formação do imunocomplexo antígeno- anticorpo (Ag-Ab), possuindo constantes de afinidade elevadas entre 10^4 a 10^{12} L mol⁻¹, conforme equações 1.1 e 1.2, ela irá assegurar métodos com alta seletividade e sensibilidade. A formação do imunocomplexo é dada por ⁶⁵:



$$K_a = \frac{[\text{Ag-Ab}]}{[\text{Ag}] [\text{Ab}]} \quad (1.2)$$

Os imunossensores do tipo sanduíche são os mais estudados quando são utilizadas técnicas eletroquímicas devido sua alta especificidade. Estes imunossensores fazem uso de diferentes tipos de anticorpos afim de garantir maior seletividade ao ensaio ⁶⁴. Os anticorpos são em geral escolhidos a partir de diferentes fontes, tais como: anticorpos produzidos por diferentes animais hospedeiros (como coelho, rato ou ovelha) e que são específicos para um tipo de antígeno apenas; anticorpos com diferentes sorotipos para o mesmo antígeno; combinação do anticorpo

com outro tipo de marcação que pode ser um aptâmero; uma proteína do receptor ou um anticorpo para o antígeno específico ^{66,67}. De modo geral, os imunossensores tipo sanduíche consistem na imobilização do anticorpo em uma superfície do eletrodo e, após a reação com o analito, monitora-se a reação de bioafinidade por um sistema constituído por um anticorpo específico para o analito conjugado a um marcador. Esta imobilização do anticorpo geralmente é realizada por meio de ligações covalentes entre seus grupos funcionais e aqueles presentes na superfície do eletrodo, devido à estabilidade destas ligações diante de variações físico-químicas. Faz-se necessário o uso de marcação com enzimas ou outros tipos de marcadores, uma vez que a maioria dos anticorpos e antígenos não apresentam resposta redox ⁶⁸.

A construção de imunossensores torna-se limitada quando se utiliza a superfície sólida do eletrodo para detecção, devido à redução da transferência eletrônica, pois as moléculas de anticorpo quando ligadas bioespecificamente podem bloquear a superfície do sensor, este bloqueio pode inviabilizar sua capacidade de detecção com sensibilidade limitada e altos limites de detecção e, devido à diminuição do sinal analítico ^{65,66,69}. Para minimizar estas limitações tem-se buscado estratégias para amplificação do sinal analítico tornando os imunossensores viáveis para detecção de analitos em concentrações muito baixas. Desta forma, o uso de nanomateriais como nanopartículas de ouro ⁷⁰, e outros compostos como partículas magnéticas ⁷¹ e lipídeos ⁷² tem sido empregados tanto para a modificação da superfície, como para estabelecer uma ligação efetiva entre os anticorpos e antígenos ^{65,73}.

1.4 - ESTRATÉGIAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE SINAL ANALÍTICO

1.4.1 - Nanopartículas de ouro

Nanopartículas de ouro (AuNPs) vem sendo largamente utilizada para a modificação da superfície de transdutores e para o reconhecimento de biomoléculas tornando-se atraente na área de imunoenaios eletroquímicos, devido às vantagens agregadas ao uso destes nanomateriais tais como elevada área superficial, facilidade de modificação da superfície das AuNPs com possibilidade de imobilização de biocompostos e propriedade redox bem características possibilitando o seu uso como marcador eletroquímico. Vale ressaltar que o uso destas nanopartículas oferecem um

microambiente compatível para a imobilização de materiais biológicos como enzimas, proteínas, entre outros, de modo que a reação de transferência eletrônica é favorecida entre o material imobilizado e a superfície do biossensor ^{74,75}.

Trabalhos reportados na literatura ilustram resultados promissores do uso de AuNPs em imunossensores, permitindo construir dispositivos sensores com elevada seletividade e baixos limites de detecção, tornando-os ferramentas promissoras para detecção de biomarcadores voltados para aplicações em análises clínicas. Uliana e colaboradores detectaram o biomarcador receptor de estrógeno alfa (ER α) em lisados de células de câncer de mama utilizando um imunossensor, cuja superfície transdutora foi modificada com AuNPs e anticorpos monoclonais. Os autores obtiveram limites de detecção ultrabaixos, da ordem de 10 fg mL⁻¹ para a detecção ER α em amostras de soro fetal bovino fortificadas e aplicaram com sucesso o imunensaio desenvolvido em amostras de lisados celulares ⁷⁶. Suresh *et al.* propuseram recentemente o uso de AuNPs e quitosana para formação um filme de nanocompósito sobre a superfície de um eletrodo impresso, e obtiveram limites de detecção na ordem de 1,0 pg mL⁻¹ para a detecção de antígeno específico da próstata (PSA) pelo método de adição de padrão em amostras de soro, plasma e urina ⁷⁷.

1.4.2 - Monocamadas auto-organizadas

O uso de monocamadas auto-organizadas (do inglês: *self assembled monolayers- SAM*) é bem explorado na construção de transdutores eletroquímicos à base de ouro, uma vez que este metal é inerte, além de ser um substrato muito utilizado em análises espectroscópicas, como também eletroquímicas decorrente da estabilidade em uma ampla janela de potenciais (-0,5 a 1,4 V vs. Ag | AgCl) ^{78,79}.

Para a formação das monocamadas tem-se explorado o uso de alcanotióis e tióis, devido à ligação espontânea e covalente da molécula de enxofre com a superfície do ouro (ligação Au-S). A auto-organização é formada devido a estrutura espacial (camada intermediária), decorrente das interações moleculares decorridas de forças de Van der Waals que contribuem para a estabilidade e conseqüentemente a auto-organização das monocamadas, quanto maior o comprimento da cadeia alquila, maior a estabilidade ⁸⁰. A auto-organização promove uma projeção mais adequada dos grupos terminais de tióis funcionalizados, podendo estes grupos serem amino, carboxílico, tosil, entre outros. Estes grupos possibilitam interações específicas

entre a superfície do transdutor e o analito alvo, e propiciam a formação de estruturas similares à células e portanto adequadas à imobilização de biomoléculas ⁸¹. A configuração promovida pelo uso de SAM assegura a obtenção de biossensores com boa sensibilidade, reprodutibilidade e baixos limites de detecção, tornando-os viáveis para aplicação em matrizes complexas, como amostras clínicas, ambientais e de alimentos. Em vista das vantagens inerentes às SAM, muitos trabalhos fazem uso destas buscando por dispositivos e sensores que apresentem alta estabilidade, melhor biocompatibilidade e maior tempo de meia vida para imobilização de compostos biológicos como também respostas rápidas proporcionadas aos ensaios eletroquímicos ^{78,80,81}.

Carvajal e colaboradores utilizaram SAMs para a detecção de receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2). Estas SAM foram utilizadas para ancorar anticorpos de forma eficiente e aplicadas em um imunoenensaio do tipo sanduíche. O dispositivo foi aplicado em amostras fortificadas com o biomarcador apresentando respostas em aproximadamente 15 minutos e com um limite de detecção de 12 pg mL^{-1} ⁸². Soares *et al.* propuseram um imunossensor para a detecção de CA 19-9 em amostras de câncer de pâncreas com o uso de eletrodos interdigitados de ouro modificados com monocamadas auto-organizadas de ácido 11-mercaptoundecanóico e anticorpos e anticorpos anti-CA 19-9. O dispositivo apresentou limite de detecção de $0,68 \text{ U mL}^{-1}$ ao analisar dados de capacitância, e o mesmo foi aplicado com sucesso em amostras de pacientes com diferentes concentrações de CA 19-9 ⁸³.

1.4.3 - Partículas magnéticas

As partículas magnéticas (PMs) são constituídas geralmente por óxido de ferro (Fe_2O_3 ou Fe_3O_4), podendo ou não estar recobertas com metais: como ouro ⁸⁴ ou prata ⁸⁵. A utilização das PMs podem levar a um aumento no desempenho de imunossensores decorrente do aumento da área superficial e conseqüente maior número de antígenos e/ou anticorpos imobilizados sobre sua superfície, bem como pela possibilidade de captura e separação do biomarcador da matriz da amostra, além de etapas de pré-concentração e detecção com amplificação de sinal ⁸⁶. A funcionalização das PMs com diferentes grupos como: tosila ⁸⁶, grupos amino ⁷¹ e carboxílicos ⁸⁷ permitem diferentes estratégias para a imobilização de anticorpos e proteínas ^{70,88}, permitindo uma ampla variedade de aplicações analíticas ⁸⁹⁻⁹¹.

As PMs possuem uma série de vantagens quando empregadas em imunoenaios eletroquímicos como elevada área superficial, elevada capacidade para ancoramento de biocompostos, captura do analito com uso de imãs, redução de interferentes devido etapas de lavagem, uma vez que elas são capazes de separar os complexos de bio-reconhecimento, e deste modo ampliar o sinal analítico de detecção do complexo antígeno/anticorpo devido à pré-concentração do analito ⁹². Devido às características intrínsecas das PMs, elas têm ganhado interesse em aplicações na área clínica, uma vez que às mesmas podem propiciar limites de detecção ultrabaixos para quantificação de biomarcadores. Otieno e colaboradores utilizaram as PMs para ancorar centenas de milhares de anticorpos policlonais e HRP por partícula, a fim de detectar os biomarcadores interleucina 6 e interleucina 8 em linhagens de células de câncer oral, cujos limites de detecção foram de 5,0 e 7,0 fg mL⁻¹, respectivamente ⁸⁸. de Oliveira *et al.* utilizaram PMs para detecção de HER-2 em amostras de soro de pacientes com câncer de mama, e obtiveram baixos limites de detecção da ordem de 6 µU mL⁻¹ e resultados concordantes com valores encontrados nas amostras de pacientes obtidos utilizando o método ELISA ⁹³.

1.4.4 - Lipídeos

Com o intuito de aumentar a estabilidade de biossensores, os lipídeos vem despertando interesse na área de bioanalítica, aumentando seu tempo de vida e melhorando sua eficiência, uma vez que proporcionam grande área superficial e capacidade de encapsulação relativamente grandes propiciadas pelas quantidades de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos e conseqüentemente podem amplificar a intensidade do sinal ⁷². Os lipídeos possuem baixa solubilidade em água, porém em concentrações apropriadas e utilizando grupos e cadeias cujos tamanhos sejam adequados pode-se ocorrer a formação espontânea de bicamadas ou multicamadas sobre a superfície do eletrodo ou partículas, como também podem levar a formação de micelas e lipossomos em meio aquosos ⁹⁴.

Para a formação de bicamadas fosfolipídicas tem-se usado a fosfatidilcolina, que é o principal fosfolipídio e mais abundante nas membranas biológicas de plantas e de animais. Esta molécula pode ser extraída da gema do ovo ou do óleo de soja. Quando utilizada em conjunto com esteroides, como por exemplo o colesterol, aumentam a estabilidade das membranas fosfolipídica na presença de fluídos biológicos devido suas propriedades lipofílicas, modulando a fluidez da membrana e

reduzindo sua permeabilidade. Em soluções aquosas, esses compostos formam uma bicamada lipídica com um interior hidrofóbico e uma superfície hidrofílica.⁹⁵

O uso de lipídeos tem-se tornado atrativo devido a possibilidade de formação de biomembrana que pode funcionar não apenas como uma barreira, mas que pode servir para imobilizar biomoléculas que auxiliam no transporte de íons e funções receptoras, entre outras⁹⁴. Hianika e colaboradores propuseram um imunossensor utilizando membrana lipídicas modificadas com anticorpos para a detecção de IgE e herbicida 2,4-D. O filme lipídico foi depositado sobre de ouro, e o immunossensor foi construído por meio da ligação de anticorpo modificado com avidina e fosfolípidos biotinilados, obtendo resultados reprodutíveis da capacitância elétrica para medição da interação antígeno-anticorpo⁹⁶.

1.5 - ELETRODOS IMPRESSOS

O grande desafio no desenvolvimento e aplicação de biossensores eletroquímicos na área clínica está em tornar o uso destes dispositivos viáveis como ferramentas de diagnóstico, bem como em avaliações terapêuticas em pontos de atendimento. Neste sentido, diferentes métodos para a construção destes dispositivos vêm sendo estudadas com o intuito de viabilizar a detecção de biomarcadores de forma precisa, reprodutível e com baixos limites de detecção⁹⁷.

A facilidade na fabricação de eletrodos impressos tem ganhado grande atenção devido à versatilidade da técnica em propiciar eletrodos descartáveis e em diferentes formatos e arquiteturas. O eletrodo impresso pode ser definido como um filme depositado sobre um suporte inerte. Este filme é parcialmente coberto com um isolante, para definir a área exposta dos eletrodos e a dos contatos elétricos. A fabricação de um sistema contendo eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, pode ser realizada em um mesmo suporte formando uma célula eletroquímica completamente descartável. O filme é formado utilizando-se tintas com alta condutividade à base de carbono ou nanopartículas de metais, que pode ser modificado para conter compostos de interesse, como por exemplo, mediadores redox⁹⁸. A vantagem dos eletrodos descartáveis frente aos eletrodos convencionais tradicionais é sua simplicidade, que permite o desenvolvimento de sistemas portáteis e não necessitam de constantes etapas morosas de limpeza e modificação da superfície eletródica. Os baixos limites de detecção e a seletividade de eletrodos

impressos são proporcionadas pela combinação da composição e da modificação química destes eletrodos ⁹⁹.

A utilização de técnicas para fabricação de eletrodos descartáveis como a serigrafia e impressão à jato de tinta ganharam grande impulso nos últimos anos, devido à facilidade de criar diferentes formatos de eletrodos, ou seja, sistema flexíveis para uma gama de aplicações, proporcionando também métodos de imobilização de materiais biológicos mais versáteis ^{61,62}. Ambas as técnicas possuem vantagens que devem ser destacadas como: baixo custo, capacidade de produção em larga escala, facilidade em modificar a superfície eletródica para detecção de diferentes tipos de analitos e, desenvolvimento de sistemas miniaturizados, que permitam reduzir as quantidades de amostra e reagentes utilizadas na análise ^{57,100}.

1.5.1 - Técnica de serigrafia

A técnica de serigrafia, também conhecida por *screen-printing* ou *silk-screen*, consiste em depositar a tinta sobre uma máscara negativa que é previamente fixada sob o substrato, a fim de delimitar a área de interesse na formação dos eletrodos ¹⁰¹. A possibilidade do uso de diferentes máscaras (telas) possibilita a preparação de diferentes formatos de eletrodos, como também células eletroquímicas com diferentes formatos e contendo múltiplos eletrodos de trabalho ^{57,99,101}. As etapas envolvidas nessa técnica são deposição da tinta, secagem e cura da mesma, seguida pelo uso de material isolante, a fim de definir as áreas expostas dos contatos elétricos e dos eletrodos ¹⁰¹.

A versatilidade do uso da técnica de serigrafia tem sido amplamente explorada na área de biossensores, devido à facilidade em projetar o melhor formato de eletrodos para a análise desejada e fácil integração à dispositivos portáteis ¹⁰². Arduini e colaboradores descreveram recentemente uma revisão sobre a construção de diferentes biossensores eletroquímicos para análises clínicas e que foram projetados por técnicas de serigrafia e associados à dispositivos microfluídicos baseados em papel, biossensores enzimáticos vestíveis, detecção com uso de celulares, com também imunossensores eletroquímicos inovadores sem o uso de marcadores, genossensores descartáveis, entre outros ¹⁰³.

1.5.2 - Impressão à jato de tinta

A impressão à jato de tinta é comumente utilizada quando o material em interesse pode ser disperso em fase líquida. A tinta assim produzida é inserida em um cartucho, e por meio do bico de injeção e por meio de uma ação piezoelétrica uma gota de volume reduzido é gerada e deslocada, que sob a ação da gravidade, cai sobre o substrato em interesse definindo com grande precisão da área dos eletrodos ⁹⁸.

Recentemente, Carvajal *et al.* exploraram a importância do uso da impressão à jato de tinta na construção de um chip todo integrado e impresso sobre o substrato de kapton de poliimida, contendo oito eletrodos de trabalho e contra-eletrodo a base de ouro e um eletrodo de pseudo-referência de prata/cloreto de prata. A plataforma eletroquímica proposta foi utilizada com sucesso na construção de imunossensores e aplicada na detecção de HER-2 em amostras de soro humano fortificadas em concentrações na escala de pg mL^{-1} com taxa de recuperação de 76% a 103% ⁸².

1.6 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A busca por análises clínicas mais precisas e adequadas com o desenvolvimento de novos métodos para o diagnóstico precoce do câncer tem sido amplamente abordado nos últimos anos, com o intuito de suprir necessidades como análises rápidas, de fácil manuseio, operável em locais de atendimento (análises *point-of-care*), com alta seletividade, sensibilidade e principalmente de baixo custo ¹⁰⁴.

Novas ferramentas e métodos têm se tornado atrativos para contornar e viabilizar dispositivos com uma melhor eficiência que auxiliem na detecção precoce, direcionamento de terapia e estadiamento das doenças em análises clínicas dos cânceres de colo uterino e endometrial, sendo assim este trabalho propõem três diferentes plataformas eletroquímicas de baixo custo e descartáveis para a realização de imunoenaios para a detecção de biomarcadores proteicos no caso, a proteína tumoral p53, a proteína inibidora p16 de quinase dependente de ciclina, a ciclooxigenase- 2 e a proteína associada ao papilomavírus humano E6 em pacientes com CC e CE. Estas plataformas compreenderam o uso de nanopartículas de ouro, partículas magnéticas, lipídeos, anticorpos e antígenos específicos para cada molécula alvo, a fim de assegurar imunoenaios eficientes para a detecção de cada

proteína em soro de pacientes com câncer tanto em estágio não metastático como em estágio metastático.

A detecção eletroquímica simultânea de biomarcadores proteicos pode ser uma ferramenta promissora para o diagnóstico precoce do CC e CE, uma vez que não há um exame preventivo preciso para estes tipos de cânceres e, também não há um biomarcador específico para a doença. Este tipo de detecção é vantajoso pois permite a quantificação de duas ou mais proteínas em um mesmo ensaio, conseqüentemente é possível extrair mais dados utilizando um pequeno volume de amostra, diminuindo os custos referente à determinação de cada analito quando comparada à análise individual dos mesmos, além de poder levar a um diagnóstico mais preciso da doença.

Tendo em vista a busca por novos métodos para a detecção, reincidências e diagnóstico de câncer de colo uterino e endometrial, os objetivos deste trabalho de doutorado constituíram em:

- ✓ Desenvolver diferentes plataformas eletroquímicas com elevada seletividade, baixo custo e descartáveis para a realização de imunoenaios para a detecção dos biomarcadores proteicos: Tp53, p16, COX-2 e E6 em pacientes com CC e CE.

Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

- ✓ Fabricar dispositivos eletroquímicos usando diferentes arranjos de eletrodos e materiais totalmente descartáveis e de baixo custo.

- ✓ Utilizar eletrodos impressos confeccionados pelas técnicas de serigrafia e impressão à jato de tinta.

- ✓ Verificar a viabilidade de se utilizar nanomateriais, partículas magnéticas, lipídeos, anticorpos e antígenos específicos para cada molécula alvo a fim de assegurar imunoenaios eficientes para a detecção de cada proteína em soro de pacientes com câncer em estágio não metastático e estágio metastático.

- ✓ Verificar a aplicabilidade e exatidão dos métodos comparando-os com o método de ELISA.

CAPÍTULO - 2

Desenvolvimento de um novo
imunossensor eletroquímico para a
detecção simultânea de Tp53 e COX-2
em pacientes com câncer cervical e
endometrial

O primeiro método proposto combinou a simplicidade da técnica de serigrafia para a confecção dos eletrodos impressos com o uso de imunoenaios do tipo sanduíche para propiciar a detecção multiplexada de COX-2 e TP53. A fim de assegurar uma detecção adequada destas proteínas em amostras de soro de pacientes, esta estratégia combinou o uso de eletrodos modificados com nanopartículas de ouro com o uso de partículas magnéticas decoradas com anticorpos e enzimas.

2.1 - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções aquosas foram preparadas com água purificada por um sistema Millipore Milli-Q® (resistividade específica < 18,2 MΩ cm a 25 °C).

Soluções estoques de 1,0 mg mL⁻¹ de anticorpo monoclonal e policlonal anti-COX-2 e a proteína COX-2 foram obtidos da Abcam (Portsmouth, EUA). Soluções estoque de 1,0 mg mL⁻¹ de anticorpo policlonal (anti-p53), 1,0 mg mL⁻¹ de anticorpo policlonal marcado com a enzima peroxidase (anti-p53-HRP) e 2,0 mg mL⁻¹ do peptídeo p53 foram adquiridos da Imuny Biotechnology (Campinas, Brasil). Os reagentes poli(cloreto de dialildimetilamônio), polioxietileno Sorbitano 20 (Tween® 20), peroxidase de rábano silvestre (horseradish peroxidase), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, N-hidroxissuccinimida, ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico, ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico, hidroquinona, peróxido de hidrogênio (30% m/v), glicina, borohidreto de sódio, L-glutationa reduzida, ácido tetracloroaurato (III) hidratado e albumina de soro bovino foram adquiridos através da Sigma–Aldrich (San Luis, Estados Unidos). Os reagentes metanol, ácido acético, fosfato de sódio dibásico anidro, fosfato de sódio monobásico anidro, cloreto de sódio, cloreto de potássio e hidróxido de sódio foram obtidos da Synth (Diadema, São Paulo). A tinta de carbono foi adquirida da ElectroDag (Düsseldorf, Alemanha) e a tinta de prata/cloreto de prata da Gwent Electronic Materials (Pontypool, Reino Unido). As PMs carboxiladas, Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid, foram adquiridas comercialmente da Thermofisher/Invitrogen (Waltham, Estados Unidos), com diâmetros médios de 1,0 µm e concentração de 10 mg mL⁻¹. Folhas de transparência para impressora a laser, cartão de adesivo dupla face e papel vinílico foram obtidos no mercado local. As amostras de pacientes com câncer cervical e endometrial foram

cedidas pelo Hospital de Amor de Barreto com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa pela Universidade Federal de São Carlos (CAAE: 53407516.4.1001.5504).

As medidas de pH das soluções foram feitas em um pHmetro Digimed modelo DM20, equipado com um eletrodo combinado de vidro Sensoglass SC08. Para a etapa de cura das tintas na fabricação dos eletrodos utilizou-se estufa da marca Nova Ética. Uma balança analítica BEL Engineering, modelo Mark 210A com precisão de $\pm 0,1$ mg foi utilizada para pesagem dos reagentes. Um multipotenciostato DropSens modelo μ stat8000 (Asturias, Espanha) acoplado a um computador portátil gerenciado pelo software DropView 8400 foi utilizado nas medidas eletroquímicas.

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução foi utilizado um microscópio JEOL modelo 7500F, com energia de feixe de elétrons de 25 keV. Para análises eletrônicas de transmissão com alta resolução utilizou-se MET TECNAI modelo G2F20. Nas análises de ângulo de contato foi utilizado um goniômetro modelo KSV CAM200.

Para a construção das telas de serigrafia, uma impressora de recorte Silhouette modelo CAMEO (Belo Horizonte, Brasil) foi utilizada, e os desenhos com os contornos dos eletrodos foram realizados utilizando o *software* Silhouette Studio V3.

2.2 - PARTE EXPERIMENTAL

O imunoenensaio do tipo sanduíche adotado neste projeto pode ser resumido pela figura 2.1 e dividido em 4 etapas.

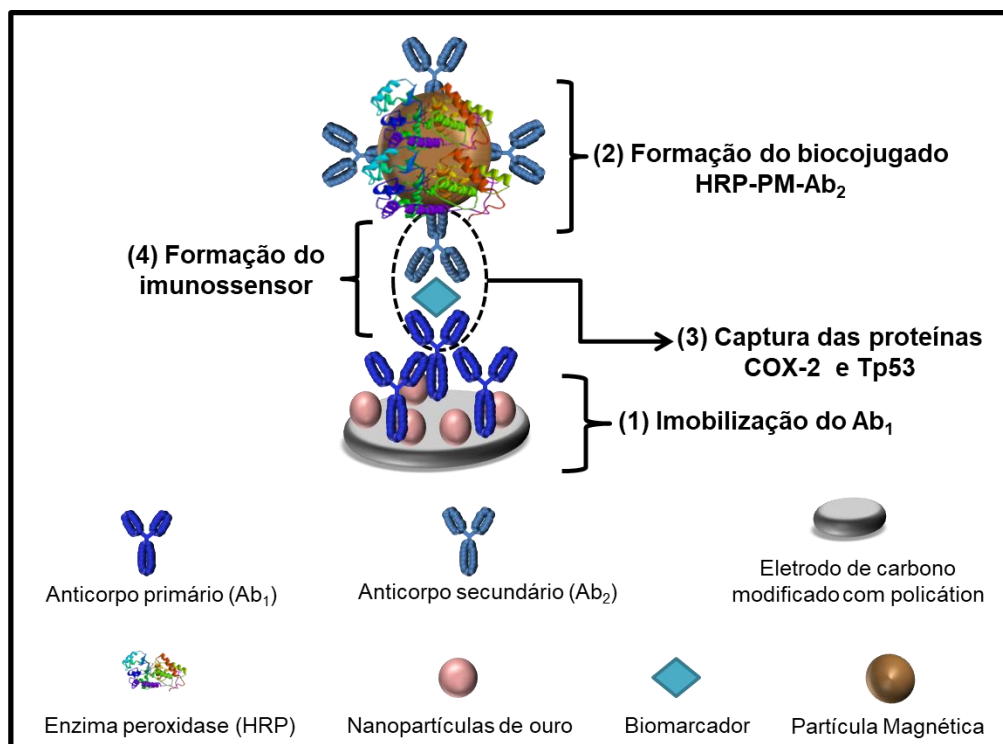


FIGURA 2.1 – Representação esquemática do imunossensor proposto.

Cada etapa envolvida neste método foi abordada detalhadamente nos itens subsequentes.

2.2.1 - Fabricação de eletrodos descartáveis pela técnica de serigrafia

A célula eletroquímica utilizada neste trabalho, compreendem um arranjo entre duas folhas de poliéster, uma contendo 8 eletrodos de trabalho confeccionados em carbono (área aproximada 2 mm^2) e outra com um contra-eletródo, também de carbono, e um eletrodo de pseudo-referência de prata/cloreto de prata ($\text{Ag}|\text{AgCl}$), ambos processos de preparação foram conduzidos usando a técnica de serigrafia, descrito anteriormente por Oliveira. *et. al.* e Uliana *et al.* ^{76,93}. A figura 2.2 A e B representam as etapas envolvidas na confecção dos eletrodos

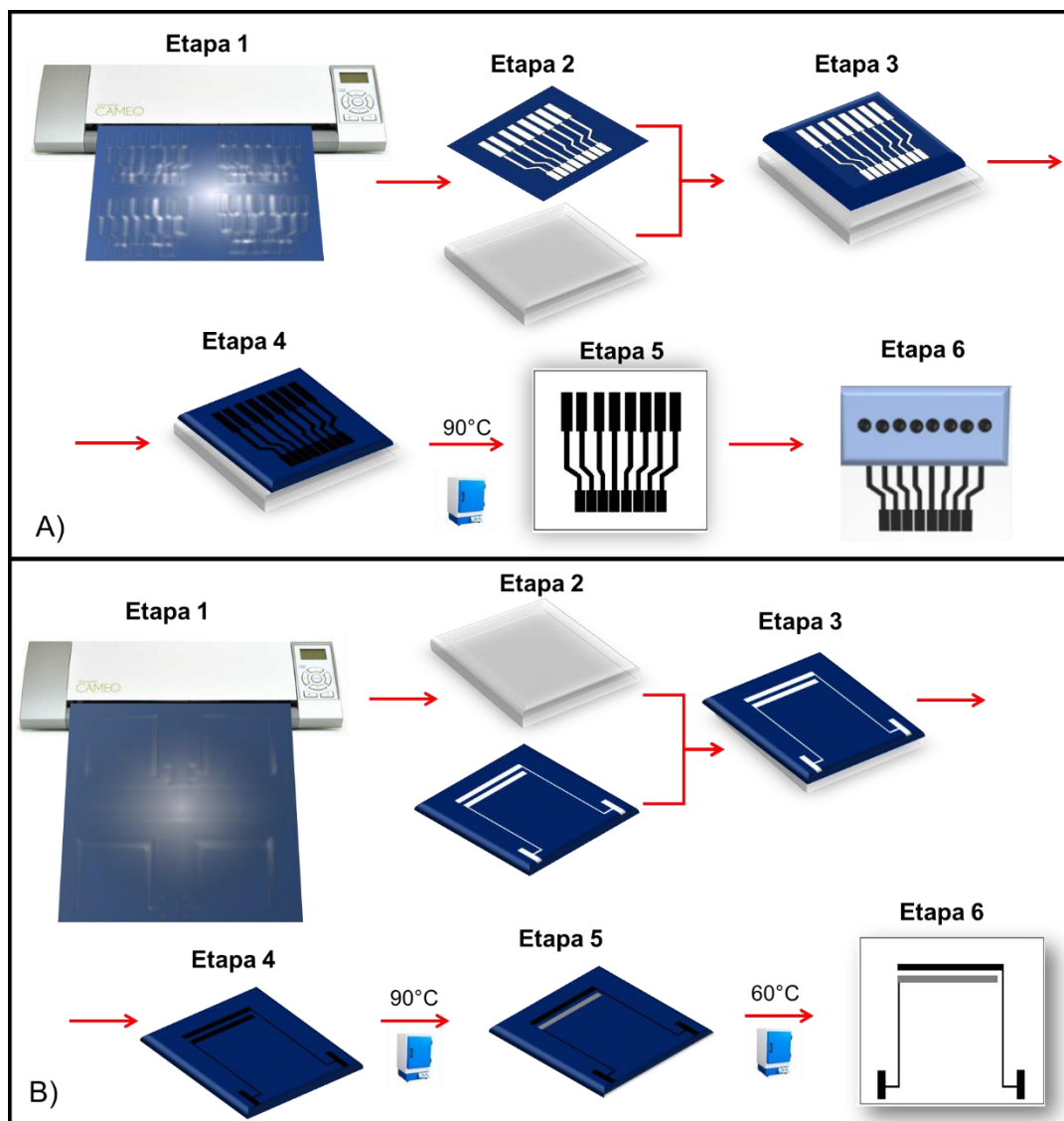


FIGURA 2.2 – Representação esquemática da fabricação dos eletrodos pela técnica de serigrafia: confecção de A) oito eletrodos de trabalho e B) do contra-eletrodo e do eletrodo de referência.

Para confecção do arranjo de eletrodos de trabalho realizou-se as etapas ilustradas na figura 2.2 A. A etapa 1 consistiu na formação de uma máscara negativa com os formatos dos eletrodos, a qual foi desenhada utilizando o software Silhouette Studio v3. Para isto, uma folha de material vinílico foi fixada sobre a base de recorte, e os moldes dos eletrodos foram recortados com o auxílio de uma impressora de recorte Silhouette modelo CAMEO. Na etapa 2 e 3, as partes designadas aos eletrodos foram retiradas com o auxílio de uma pinça para formação de uma máscara negativa e, a mesma foi fixada a um substrato de poliéster. A etapa 4 consistiu na deposição da tinta condutora de carbono com auxílio de um pequeno rodo. Em

seguida, o tratamento térmico foi realizado em estufa a 90 °C por 30 minutos para a cura da tinta de carbono com posterior retirada do material vinílico (etapa 5). Para a delimitação da área dos eletrodos de trabalho, representada pela etapa 6, recortou-se uma máscara contendo oito circunferências de 2 mm cada uma com o auxílio da impressora de recorte e, fixou a mesma sobre a superfície dos eletrodos. Para o eletrodo de referência, representada pela figura 2.2 B, diferiu-se as etapas 5 e 6, que consistiram na deposição da tinta Ag|AgCl na área específica relacionada ao eletrodo de pseudo-referência, a cura da tinta a 60 °C por 30 minutos e a remoção do vinil para a obtenção dos eletrodos, respectivamente.

2.2.2 - Modificação dos eletrodos de trabalho (8-ET)

A modificação inicial dos oito eletrodos de trabalho (8-ET), apresentada na figura 2.3, foi realizada pela formação de uma bicamada formada pela interação eletrostática de poli(dimetil-dialilamônio) (PDDA) e nanopartículas de ouro contendo glutathione (AuNPs-GSH), seguindo procedimento previamente reportado na literatura por Chikkaveeraiah e colaboradores com algumas modificações⁸⁷. As AuNPs foram sintetizadas e mantidas em tampão HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico) pH 8, conforme o método descrito por Zheng e colaboradores, com o uso de NaBH₄ (borohidreto de sódio) como agente redutor e glutathione como agente modificador, decorando as nanopartículas com grupos carboxílicos¹⁰⁵.

Inicialmente, 5 µL de uma solução de polycations(PDDA), 2,0 mg mL⁻¹, contendo NaCl 0,05 mol L⁻¹, foi adicionada na superfície de cada eletrodo de trabalho. Após 20 minutos o arranjo de eletrodos foi enxaguado com água e, as superfícies dos eletrodos foram secas à temperatura ambiente. Após a formação da camada de PDDA, a etapa da adsorção das AuNPs-GSH foi realizada. Alíquotas de 5 µL (solução estoque 0,24 µmol L⁻¹) de AuNPs foram adicionadas sobre os eletrodos de trabalho e mantida durante 20 minutos, em seguida, os eletrodos foram lavados com água e secos a temperatura ambiente.

A fim de assegurar a efetiva imobilização dos anticorpos na superfície dos 8-ET, utilizou-se AuNPs carboxiladas para interagir com o grupo amino de anticorpos por meio de ligação covalente entre este grupo formando amida. A reação entre os grupos carboxílico e amino não são estáveis quando realizada diretamente, uma vez que sofrem hidrólise facilmente. Por esta razão, acoplamento entre estes grupos

funcionais (entre o substrato e proteína) é geralmente obtida com uso de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC). O EDC foi usado com sucesso na imobilização das biomoléculas com a ativação dos grupos carboxílicos das AuNPs para posterior conjugação com os anticorpos, devido à excelente biocompatibilidade e condições de reação amena ^{70,76,106}. Este composto de alta reatividade promove o ataque nucleofílico da amina, resultando na formação de uma ligação amida. O primeiro passo envolveu a formação do intermediário *o*-acilurea, formado a partir da reação entre o EDC e os grupos carboxílicos. O aumento da estabilidade do éster ativo pode ser assegurado com o uso de N-hidroxissuccinimida (NHS), criando NHS-ésteres reativos com aminas de biomoléculas, conseqüentemente, aumentando as reações de acoplamento mediadas por EDC ^{76,106}. Para tanto, utilizou-se uma mistura de EDC/NHS para o acoplamento NHS-éster estável com os anticorpos ^{70,76,106}. Na figura 2.3 estão representadas as etapas envolvidas na ativação dos grupos carboxílicos das AuNPs e imobilização dos anticorpos. Para a imobilização covalente dos anticorpos, os grupos carboxílicos presentes nas AuNPs depositadas sobre os 8-ET foram efetivados com a adição de 5 μL de uma solução de EDC/NHS (400 mmol L^{-1} e 100 mmol L^{-1} , respectivamente) recém preparada. Após o tempo de 10 minutos, os eletrodos foram lavados com água e, em seguida, a imobilização dos anticorpos monoclonais nos 8-ET foi realizada com a adição de 5 μL de uma solução $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo os anticorpos monoclonais (Ab_1). Os anticorpos referentes ao COX-2 foram adicionados em quatro eletrodos e, nos quatros restantes foram modificados com Ab_1 para Tp53. O dispositivo foi mantido por um período de 18 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para garantir a imobilização adequada dos Ab_1 sobre a superfície dos 8-ET.

Após este tempo, os eletrodos foram lavados com 10 mmol L^{-1} de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4. Para evitar reações não específicas, uma alíquota de 5 μL de solução 2% (m/v) de albumina de soro bovino (BSA) foi adicionada na superfície de cada um dos 8-ET modificados durante 60 minutos a fim de bloquear os sítios ativos remanescentes, conforme representado na figura 2.3. Após a imobilização dos Ab_1 sobre a superfície dos 8-ET, estes foram mantidos à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento do uso.

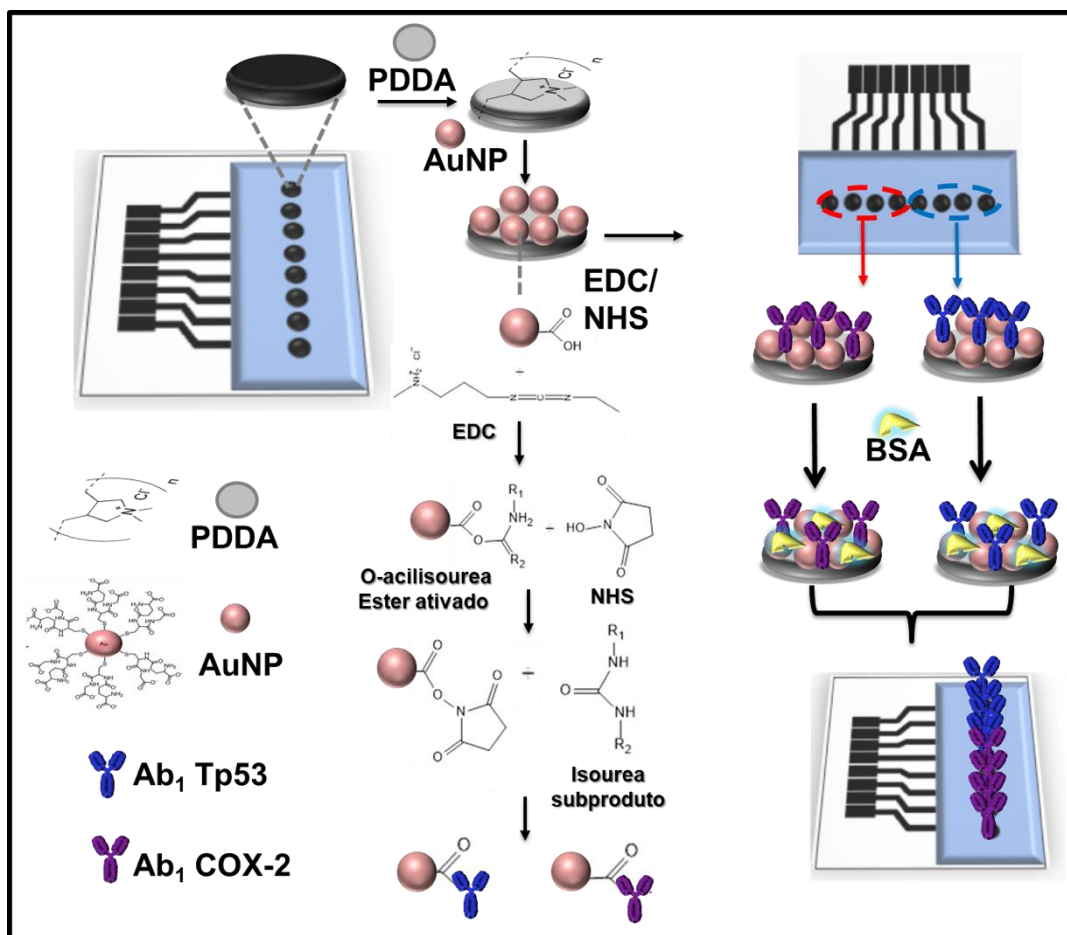


FIGURA 2.3 – Representação esquemática da modificação dos 8-ET pela formação da bi-camada de PDDA e AuNPs, ativação dos grupos carboxílicos com EDC/NHS e imobilização dos Ab₁ para COX-2 e Tp53.

Uma vez prontos os imunossensores, procedeu-se com a montagem da célula microfluídica descartável. Um cartão adesivo dupla face foi empregado para selar o contra eletrodo e o eletrodo de referência juntamente com os 8-ET, conforme representado na figura 2.4. Orifícios para a entrada e saída de solução foram feitos com auxílio de uma agulha. O cartão adesivo dupla face foi previamente cortado com o auxílio de uma impressora de recorte para formar o canal microfluídico com as seguintes dimensões, 0,5 mm de largura, 44 mm de comprimento e 0,3 mm de espessura, perfazendo um volume total de 90 μ L. O cartão adesivo dupla face foi posicionado de forma a manter alinhados os eletrodos de trabalho de um lado e os eletrodos de referência e contra eletrodo do outro.

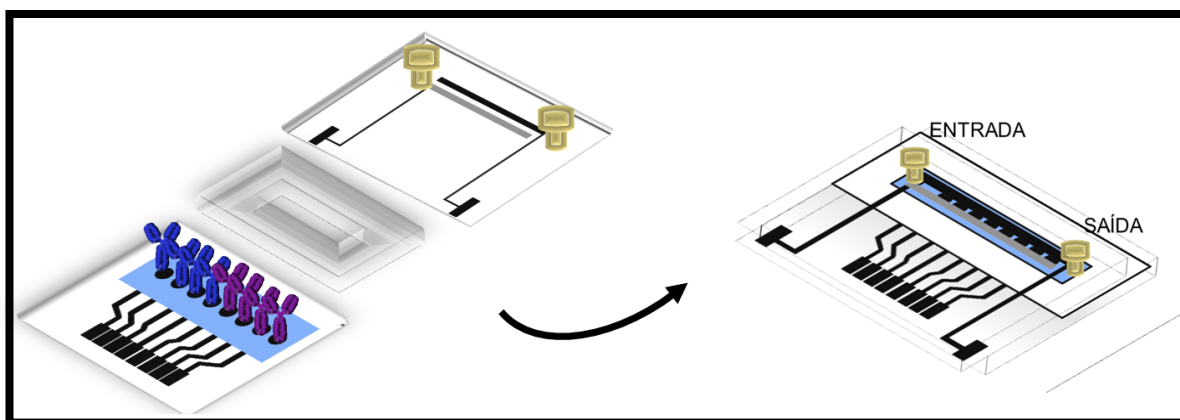


FIGURA 2.4 – Representação esquemática da montagem da célula eletroquímica microfluídica.

Após a montagem da célula microfluídica, tubos de poli(éter-éter-cetona) (PEEK) com 0,2 mm de diâmetro interno foram acoplados na saída e entrada do fluxo com o auxílio de uma fita adesiva (3M). A entrada da célula microfluídica foi conectada a uma válvula de injeção cromatográfica manual (Modelo 7725i, Rheodyne), contendo alça de amostragem de 100 μL , que se encontra acoplada ao sistema de propulsão dos fluídos composto por uma bomba de seringa (New Era Pump System, Farmingdale, EUA). A célula microfluídica foi conectada ao multipotenciostato por meio de conectores elétricos para a etapa de detecção eletroquímica. A figura 2.5 ilustra o sistema microfluídico com os seus componentes utilizado neste trabalho.

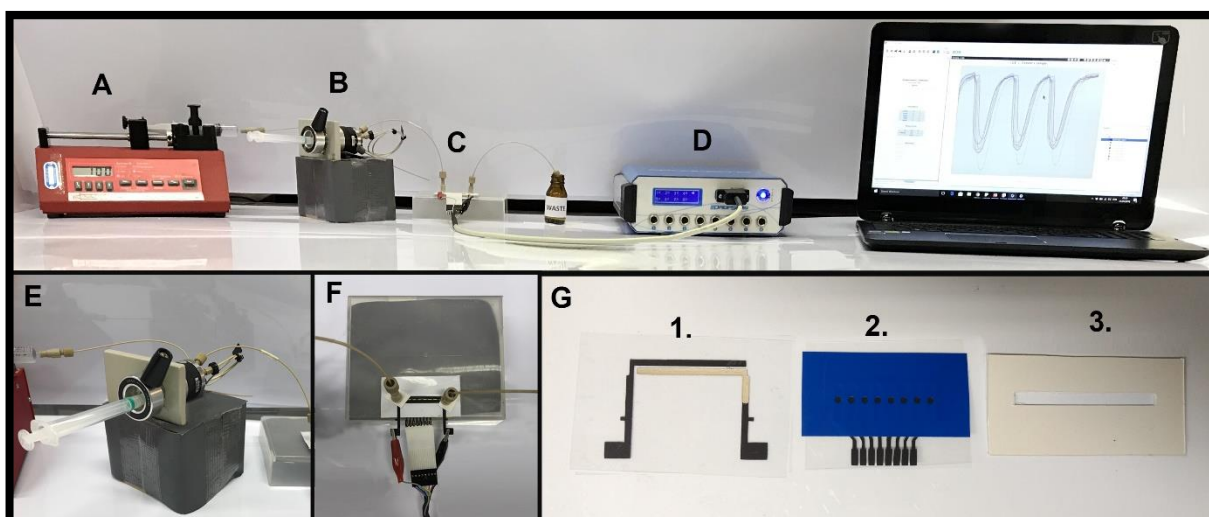


FIGURA 2.5 – Sistema microfluídico composto por A - bomba de seringa, B – válvula de injeção, C – célula microfluídica e D - multipotenciostato interfaceado a um computador. Tem-se em E e F - zoom da válvula de injeção e célula microfluídica, respectivamente e, G – os componentes integrados desta célula 1. Eletrodo de referência e contra-eletrodo, 2. Eletrodos de trabalho modificados e 3. Cartão adesivo dupla face para formar o canal microfluídico.

2.2.3 - Modificação das partículas magnéticas com o anticorpo policlonal e enzima *horseradish peroxidase*

As partículas magnéticas comerciais carboxiladas (PMs) foram decoradas massivamente com os anticorpos policlonais (Ab_2) com a enzima peroxidase (HRP) ^{107,108}. Esta etapa de formação do bioconjugado composto por Ab_2 e HRP com PMs foi realizada tanto para o COX-2, quanto para o Tp53 e está representada na figura 2.6 A e B, respectivamente.

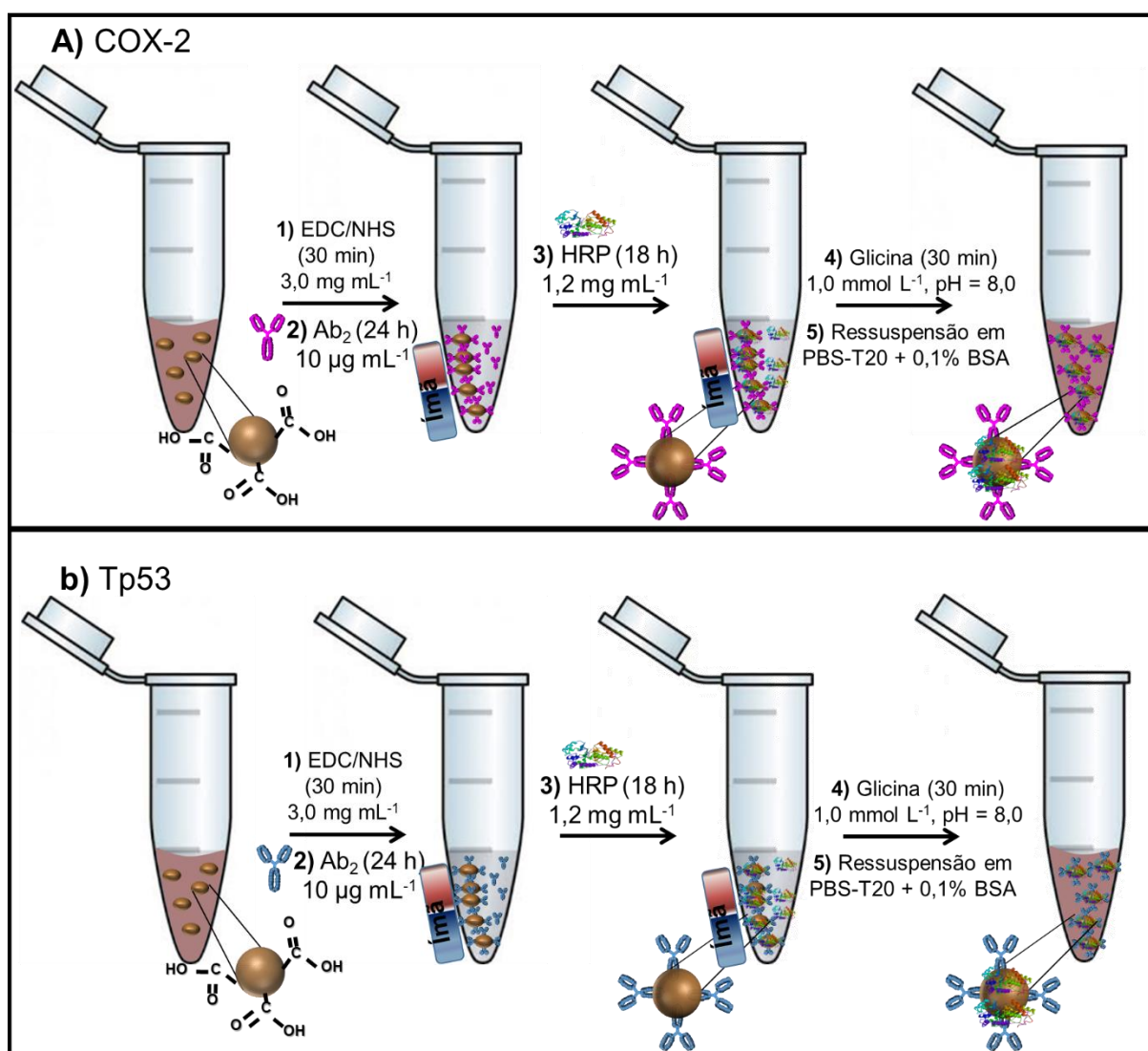


FIGURA 2.6 – Representação esquemática da formação dos bioconjugados Ab_2 -PM-HRP para A) COX-2 e B) Tp53.

Este procedimento consistiu em cinco etapas:

- **Etapa 1** – adicionou-se 200 μL de PMs, cuja concentração era de 10 mg mL^{-1} , a 200 μL de 0,01 mol L^{-1} tampão MES (ácido 2 - (N-morfolino) etanossulfônico), pH 5,2 em um microtubo de 2,0 mL. A mistura foi agitada por 2 minutos em vortex a fim de se obter uma dispersão homogênea, seguida de separação magnética, utilizando uma estante magnética, e descarte do sobrenadante. As etapas de lavagem e separação magnética foram realizadas três vezes seguidas. Em seguida, à dispersão das PMs adicionou-se 1,0 mL de solução contendo 400 mmol L^{-1} de EDC e 100 mmol L^{-1} de NHS, para ativação dos grupos carboxilas, a mistura foi mantida sob agitação lenta por 30 minutos em um agitador rotatório. Logo após, as PMs foram separadas utilizando a estante magnética e o sobrenadante foi descartado. As PMs foram lavadas com tampão MES (pH 5,2) para a remoção do excesso de EDC e NHS, com posterior separação magnética, e o sobrenadante foi descartado após cada lavagem.

- **Etapa 2** - Uma solução de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos anticorpos policlonais foi preparada em tampão MES (pH 5,2) e adicionada as PMs e, a suspensão foi mantida sob agitação rotativa por 24 horas. As partículas magnéticas conjugadas com Ab₂ foram separadas utilizando uma estante magnética e lavadas três vezes novamente com 0,01 mol L^{-1} de tampão MÊS para remover o excesso de Ab₂ não conjugados as PMS.

- **Etapa 3** - Adicionou-se então uma alíquota de 240 μL de 5,0 mg mL^{-1} HRP e 760 μL de 1,0 mmol L^{-1} PBS (pH 7,0), contendo 0,5% (m/v) de BSA e a dispersão foi agitada lentamente por 18 horas em um agitador rotativo, para garantir a eficiência da conjugação também desta enzima.

- **Etapa 4** - Após esta etapa, o bioconjugado formado das PMs com Ab₂ e HRP (Ab₂- PM- HRP) foi separado magneticamente e lavado quatro vezes com 1,0 mL de PBS, contendo 0,05% (v/v) de Tween-20 (PBS-T20) e 0,1% (m/v) de BSA. Na dispersão do bioconjugado Ab₂-PM-HRP foi adicionado 1,0 mL de glicina (1,0 mol L^{-1} , pH 8,0), agitado em vortex por 2 minutos e mantida sob agitação lenta por 30 minutos, afim de bloquear os sítios ativos remanescentes.

- **Etapa 5** - Após a etapa de bloqueio, o bioconjugado foi separado magneticamente e lavado três vezes com PBS-T20 contendo 0,1% (m/v) de BSA. O bioconjugado Ab₂-PM-HRP foi resuspendido em 400 μL de PBS-T20, contendo 0,1% (m/v) de BSA, e armazenado a 4 °C por até 3 semanas.

2.2.4 - Etapa de captura imunomagnética das proteínas COX-2 e Tp53 pelo bioconjugado Ab₂-PM-HRP

A etapa de captura dos biomarcadores proteicos foi realizada com a adição dos dois bioconjugados Ab₂-PM-HRP, previamente preparados em microtubos, contendo as soluções padrão de COX-2 e Tp53 ou as amostras de pacientes com CC e CE. A figura 2.7 ilustra a etapa de captura dos biomarcadores, sendo que uma alíquota de 10 µL de cada bioconjugado foi adicionada à 320 µL das soluções padrão ou amostras diluídas previamente em PBS (pH 7,4), e agitados em vórtex por 1 minuto. A dispersão obtida foi agitada lentamente em agitador rotatório por 40 minutos, tempo este que foi otimizado, em estufa à temperatura de 37 °C. Em seguida, os bioconjugados Ab₂-PM-HRP contendo os biomarcadores capturados foram separados magneticamente. Então, as partículas foram lavadas três vezes em PBS (pH 7,4) com 0,3% (m/v) de BSA, com a finalidade de minimizar interações não específicas, e posteriormente foram separadas magneticamente. Depois das etapas de lavagem, as PMs foram ressuspensas em 125 µL de PBS-T20 com 0,3% (m/v) de BSA.

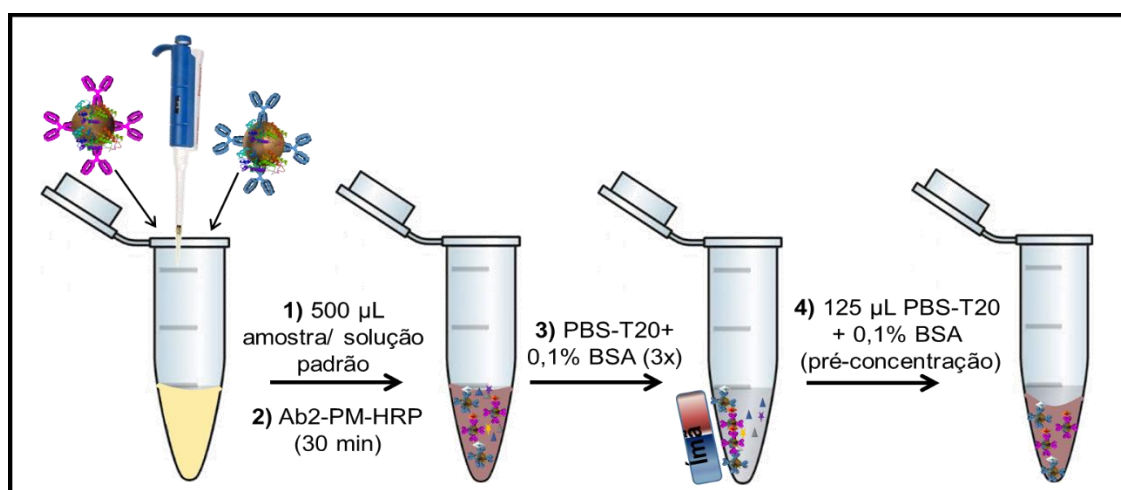


FIGURA 2.7 – Representação esquemática da etapa de captura dos biomarcadores COX-2 e Tp53.

A dispersão contendo os biomarcadores foi injetada a uma vazão de 100 µL min⁻¹ no sistema microfluídico utilizando uma válvula de injeção cromatográfica manual com uma alça de amostragem de 100 µL. Uma vez preenchido o canal microfluídico, o fluxo foi pausado por 30 minutos para a etapa de incubação e

formação da estrutura tipo sanduíche (figura 2.8). Em seguida, o fluxo foi reiniciado e o dispositivo foi lavado com uma solução de PBS-T20 com 0,1% (m/v) de BSA por cerca de um minuto, a fim de assegurar a eliminação das PMs que não interagiram com os Ab₁ presentes nos 8-ET.

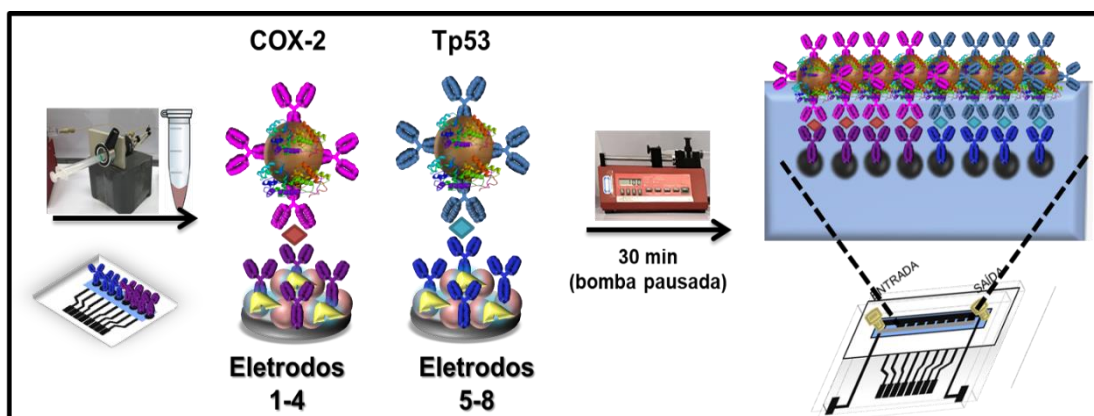


FIGURA 2.8 – Representação esquemática da formação do imunossensaio do tipo sanduíche com a injeção dos biomarcadores capturados pela HRP-PM-Ab₂ por meio da válvula de injeção cromatográfica, seguido pela interrupção da inserção de fluido no canal microfluídico pausando-se a bomba por 30 minutos e, a formação dos imunossensais sanduíches dos eletrodos de 1-4 para COX-2 e 5-8 para Tp53.

2.2.5 - Detecção eletroquímica dos biomarcadores COX-2 e Tp53

As medidas eletroquímicas foram realizadas em fluxo utilizando o dispositivo microfluídico descartável desenvolvido e uma vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$. A detecção eletroquímica dos biomarcadores proteicos foi realizada por amperometria, aplicando-se um potencial de $-0,2 \text{ V}$ (vs $\text{Ag} | \text{AgCl}$) ao eletrodo de trabalho durante a injeção da solução de detecção, que é composta por uma mistura entre o substrato da enzima, uma solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio, e o mediador redox ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de hidroquinona). A utilização de um medidor se faz necessário, uma vez que os anticorpos e antígenos não apresentam comportamento redox, portanto sob a aplicação de um potencial de $-0,2 \text{ V}$ ocorre redução do mediador eletrônico na superfície do eletrodo de forma efetiva, ou seja, a benzoquinona é reduzida à hidroquinona tornando o sinal amperométrico mensurável sobre a superfície do eletrodo ⁷⁶. Parâmetros como sensibilidade, limite de detecção, repetibilidade, intervalo linear, e a interferência da detecção de um biomarcador no outro, ou seja, de um eletrodo de trabalho na resposta analítica do outro, foram avaliados.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em meio de PBS-T20 (pH 6,5), contendo 0,1% (m/v) BSA. A curva analítica foi construída utilizando soluções padrão contendo os biomarcadores COX-2 e Tp53. A viabilidade da determinação simultânea destes biomarcadores foi realizada e comparada com a quantificação individual dos mesmos. Após a construção da curva de calibração, as medidas eletroquímicas foram realizadas em soro de pacientes com CC e CE para a quantificação destes biomarcadores proteicos. A exatidão foi avaliada comparando os resultados obtidos nas análises das amostras empregando o método proposto e o ensaio de ELISA.

2.2.6- Método comparativo ELISA

O ensaio de imunoabsorção enzimática foi realizado com o intuito de avaliar a exatidão do método proposto. Para o biomarcador COX-2, um kit ELISA do tipo sanduíche foi adquirido pela LifeSpan BioSciences (Washington, EUA) e o protocolo LS-F12321 do fornecedor foi seguido. Para isto, a placa foi sensibilizada com 50 µL das soluções padrão dos biomarcadores e amostras diluídas por 2 horas à 37 °C. A diluição foi realizada com o tampão de diluição fornecido pelo kit. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com o tampão de lavagem. Uma alíquota de 50 µL do reagente de detecção A fornecido pelo kit foi adicionado, e incubado por uma hora à 37 °C. Após etapas de lavagens, 50 µL da solução de detecção B, fornecida com o kit, foi adicionada aos poços da placa, e incubado por uma hora a 37 °C. Após etapas de lavagem, 45 µL da solução cromogênica, contendo 3',3',5',5'- tetrametilbenzidina (TMB), foi adicionada e incubada de 15 minutos até a formação da coloração azulada. Finalmente, uma alíquota de 50 µL da solução para bloqueio da reação foi adicionada. A leitura colorimétrica foi realizada em 450 nm utilizando o leitor de microplaca Labtec (LT4000).

Para o biomarcador Tp53 o kit ELISA adquirido não apresentou resposta, portanto optou-se pelo desenvolvimento do imunoensaio ELISA utilizando os reagentes disponíveis no laboratório. Neste processo, uma placa da ELISA Costar (modelo 3590, Corning Incorporated) foi sensibilizada com 50 µL das soluções padrão e amostras, previamente diluídas com tampão de carbonato de sódio (0,05 mol L⁻¹, pH 9,6), com posterior incubação a 37 °C durante 3 horas. Etapas de lavagem foram realizadas três vezes utilizando 200 µL de PBS-T20. Após esta etapa, 100 µL de uma

solução de 5 % (m/v) de leite em pó desnatado Molico (Nestlé) em PBS, como fonte de proteína caseína, foi adicionada aos poços da placa como etapa de bloqueio, e mantido por uma hora à 37 °C. Em seguida, 100 µL de 10 µg mL⁻¹ de anticorpo policlonal anti-p53 de coelho (diluído em PBS, pH 7,4) foi adicionado aos poços, e incubados a 4 °C por 18 horas. Os poços da placa foram lavados três vezes, seguidas pela adição de 50 µL anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (diluído na proporção 1:20.000 em PBS, pH 7,4) e a placa foi incubada durante uma hora à 37 °C. A placa foi lavada três vezes, em seguida foram adicionados 50 µL de TMB aos poços e, por fim, incubou-se por 15 minutos, tempo necessário para formação da coloração azulada. Para finalizar, uma alíquota de 50 µL da solução 0,2 mol L⁻¹ de ácido clorídrico foi adicionada para cessar a reação. A etapa de leitura colorimétrica foi realizada conforme mencionada anteriormente para o ELISA do COX-2.

2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 - Caracterização morfológica e eletroquímica dos eletrodos de trabalho

2.3.1.1 - Medidas de ângulo de contato, rugosidade das superfícies dos eletrodos de carbono

Na figura 2.9 são apresentadas as imagens de ângulo de contato obtidas pela técnica de gota utilizando água para cada etapa de modificação realizada na superfície do eletrodo carbono sem modificação e, em cada etapa para a formação da bicamada.

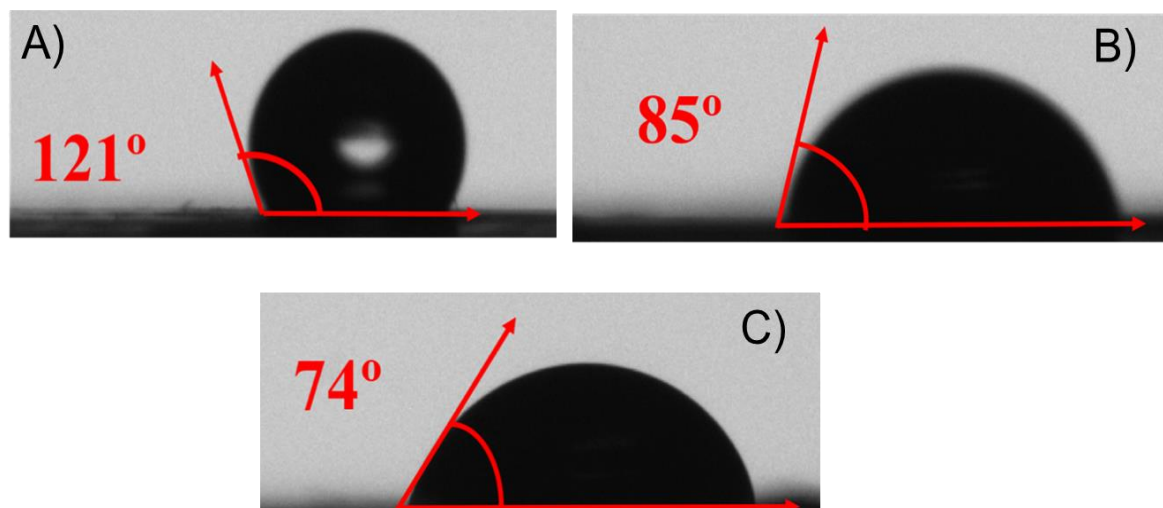


FIGURA 2.9 – Medidas de ângulo de contato realizada com a adição de uma gota de água na superfície dos eletrodos de A) carbono, B) carbono-PDDA e (C) carbono-PDDA-AuNPs.

A variação no ângulo de contato está diretamente relacionada com as modificações na superfície do eletrodo. O eletrodo de carbono sem modificação apresentou um ângulo de contato maior que 90° , indicando que este eletrodo apresentou baixa molhabilidade. Já com as modificações PDDA e PDDA-AuNPs, pode-se notar a diminuição expressiva deste ângulo, conferindo a superfície o caráter hidrofílico. O menor ângulo (74°) foi obtido com o eletrodo modificado com a bicamada, PDDA/AuNPs, uma vez que o mesmo possui grande quantidade de grupos carboxílicos devido às AuNPs decoradas com glutathione. É interessante que o ângulo de contato seja inferior à 90° , visto que soluções aquosas são utilizadas durante as interações biológicas e formação da estrutura tipo sanduíche, portanto, a hidrofiliabilidade da superfície eletródica irá permitir uma maior interação com as moléculas biológicas, garantindo uma modificação eficiente do eletrodo. Vale ressaltar que um aumento da rugosidade também é um importante fator para uma boa molhabilidade^{109,110}, portanto, para corroborar os resultados obtidos pela técnica de ângulo de contato e confirmar a modificação dos eletrodos de trabalho, mediu-se a rugosidade do eletrodo de carbono sem modificação e com a formação da bicamada de PDDA/AuNPs, em várias regiões das imagens, obtidas com uso de um microscópio confocal a laser, e se realizou a média entre elas. Na figura 2.10 são apresentadas as imagens dos filmes obtidas com o microscópio confocal com varredura a laser.

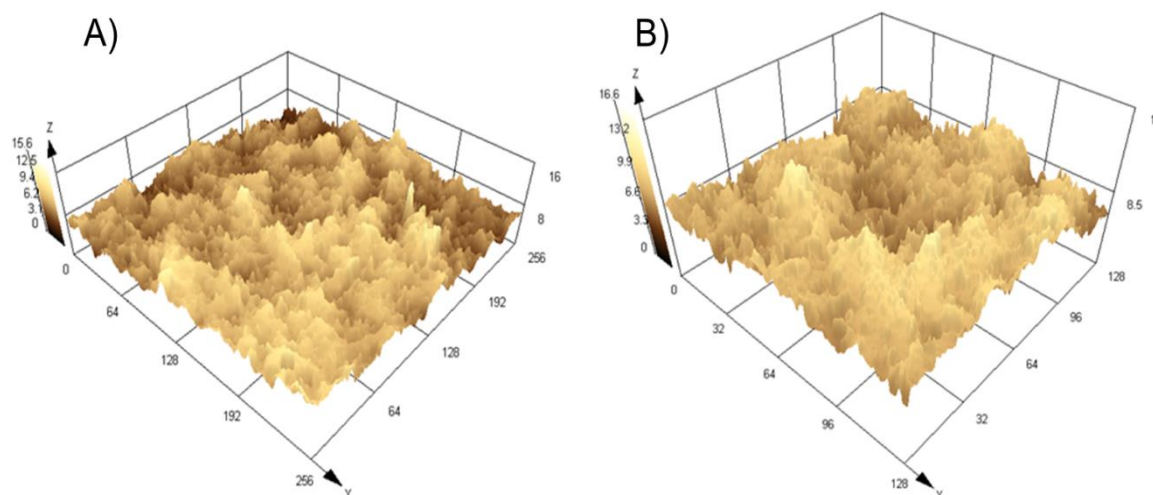


FIGURA 2.10 – Imagens da superfície do eletrodo de A) Carbono e B) Carbono-PDDA-AuNPs utilizando microscópio confocal de varredura a laser.

Na figura 2.10 pode-se observar um aumento da rugosidade em função da modificação do eletrodo. O eletrodo de carbono apresentou um valor de $0,29 \mu\text{m}$, enquanto que o eletrodo modificado com a bicamada o valor obtido foi de $0,39 \mu\text{m}$. O aumento observado na rugosidade do eletrodo após a modificação corroboram a mudança na molhabilidade observada pelas medidas de ângulo de contato ^{111,112}.

2.3.1.2 - Caracterização eletroquímica dos eletrodos desenvolvidos

Com o intuito de não apenas garantir a eficiência da formação da bicamada, como também verificar a influência da modificação com AuNPs no sinal analítico, estudos de voltametria cíclica foram realizados em uma janela de potencial de 0 a $0,6 \text{ V}$ (vs $\text{Ag} | \text{AgCl}$) tanto para os 8-ET sem modificação quanto os modificados com PDDA/AuNPs. Na figura 2.11 são apresentados os voltamogramas obtidos variando a velocidade de varredura de 10 a 300 mV s^{-1} , tanto para os eletrodo sem modificação quanto para o eletrodo com a bicamada PDDA/AuNPs, respectivamente apresentados nas figuras 2.11 A e B, assim como dependência linear da resposta de corrente anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

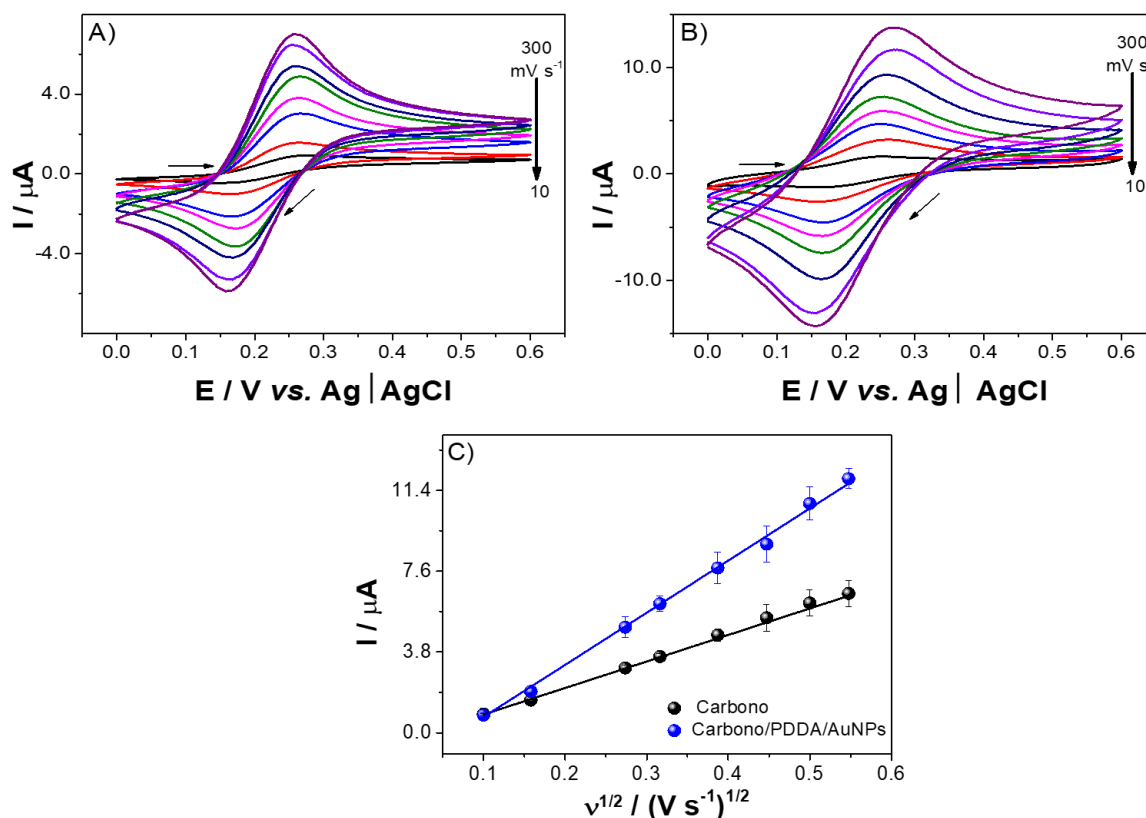


FIGURA 2.11 – Voltamogramas cíclicos em ácido ferroceno monocarboxílico com concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de A) eletrodo de carbono sem modificação, B) eletrodo modificado com PDDA/AuNPs e C) relação da variação da corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Velocidades de varredura de 10 a 300 mV s^{-1} .

Os voltamogramas cíclicos observados na figuras 2.11 A e B apresentaram um comportamento quasi-reversível, uma vez que os valores de potenciais de pico foram independentes da variação da velocidade de varredura, cujo o pico anódico localizou-se em $0,27 \text{ V}$ e o pico catódico em $0,15 \text{ V}$, aproximadamente. A influência da presença das AuNPs foi confirmada ao observar um incremento de 51% dos coeficientes angulares das curvas apresentadas na figura 2.11 C, sinal da corrente anódica pela variação da raiz quadrada da velocidade de varredura, quando se compara o eletrodo sem modificação (curva preta) com os eletrodos modificados com PDDA/AuNPs (curva azul). Sendo assim, estimou-se a área eletroativa aparente destes eletrodos tendo como base a equação de Randles-Sevcik ¹¹³: Os eletrodos não modificados apresentaram área eletroativa aparente de $2,67 \pm 0,06 \text{ mm}^2$, que é muito próxima a área geométrica. Os eletrodos modificados com a bicamada PDDA/AuNPs apresentou um valor maior de $5,27 \pm 0,11 \text{ mm}^2$. O aumento observado indica a efetiva

modificação da superfície eletródica e pode ser atribuído a presença do AuNPs na superfície do eletrodo. O uso de nanocomposto é de suma importância, não apenas por melhorar a resposta do eletrodo como também permitir a imobilização covalente dos anticorpos, sendo essencial para o desenvolvimento do método proposto.

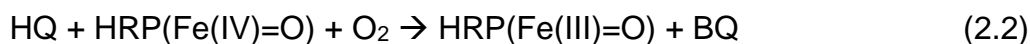
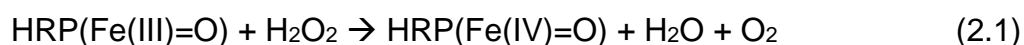
2.3.2 - Otimizações dos parâmetros experimentais para a detecção dos biomarcadores propostos

As etapas de otimização foram realizadas individualmente para cada biomarcador e, após a definição dos parâmetros experimentais, avaliou-se o desempenho ótimo do imunoenensaio para detecção multiplexada de COX-2 e Tp53 e a sua viabilidade na aplicação em amostras de pacientes com CC e CE.

Um parâmetro estudado na construção do imunossensor foi a concentração do Ab₁ utilizada para a imobilização sobre superfície dos 8-ET, visto que a quantidade do biomarcador ligado à superfície do eletrodo é essencial para a resposta do imunossensor¹¹⁴. O efeito da concentração de anticorpo para a detecção de COX-2 e TP53 foi estudado entre 1,0 e 20 µg mL⁻¹ sendo a concentração dos biomarcadores mantida constante em 10 pg mL⁻¹. As condições experimentais utilizadas para este estudo foram concentração de Ab₂ igual a 10 µg mL⁻¹, tempos de captura para COX-2 e Tp53 e de formação do imunossensor do tipo sanduíche igual a 30 min. Para as medidas eletroquímicas, uma solução padrão do biomarcador preparada em PBS foi adicionada ao microtubo contendo os bioconjugados formados por PMs decoradas com HRP e Ab₂. O imunocomplexo formado na presença de COX-2 e TP53 (figura 2.7), foi injetado usando a válvula de injeção na célula microfluídica contendo os imunossensores e a detecção foi realizada com a injeção da solução de detecção contendo H₂O₂ e HQ.

O sinal analítico referente aos biomarcadores em estudo foi obtido após o tempo de incubação de 40 minutos (tempo otimizado), e é oriundo de uma resposta indireta em função da atividade enzimática da HRP quando na presença do substrato H₂O₂ e do mediador redox HQ. A enzima HRP catalisa a redução do H₂O₂, devido à oxidação do sítio ativo da enzima, denominado grupo heme, que contém uma ferroporfirina. A HQ na sua forma reduzida doa elétrons, formando a benzoquinona (BQ), para que o sítio ativo da HRP retorne a sua forma reduzida. A BQ na superfície do eletrodo é reduzida amperometricamente à hidroquinona novamente gerando um

ciclo catalítico, produzindo o sinal analítico que será proporcional às concentrações dos biomarcadores proteicos. As reações da etapa de detecção podem ser descritas como ^{107,108}:



Na figura 2.12 são apresentadas as respostas transientes de corrente para diferentes concentrações de Ab₁ utilizadas na etapa de imobilização sobre a superfície eletródica.

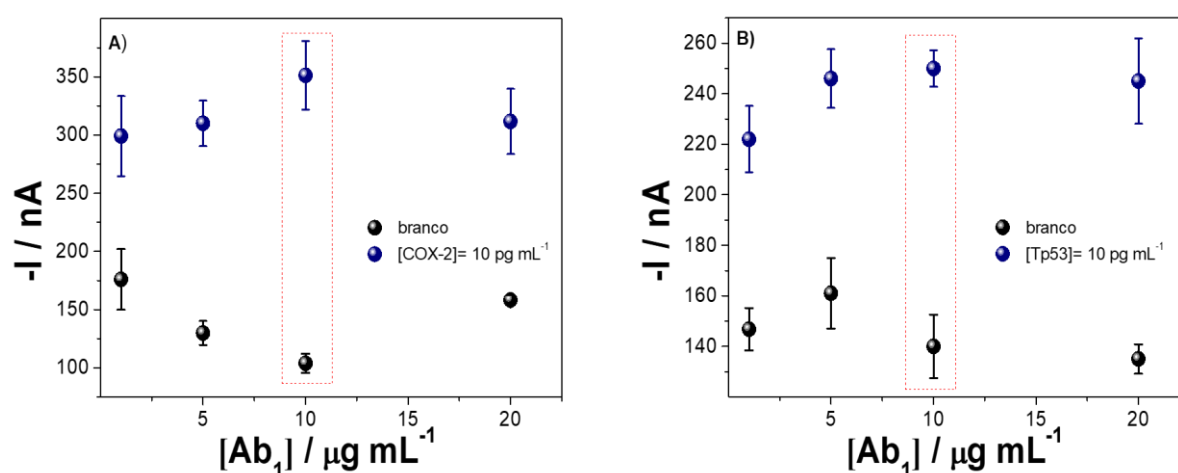


FIGURA 2.12 – Otimização da concentração de Ab₁ utilizada para na imobilização para construção do imunossensor. A resposta de corrente obtida em função da concentração de Ab₁ é apresentada para A) COX-2 e B) Tp53. Para cada concentração é apresentada a corrente do branco e da amostra. Concentração de biomarcador de 10 pg mL⁻¹, tempo de magneto-captura e de formação do sanduíche de 30 min. Solução de detecção contendo 0,1 mmol L⁻¹ de HQ e 1,0 mmol L⁻¹ de H₂O₂. Os sinais transientes de corrente foram registrados em potencial fixo -0,2 V.

Como pode ser observado na figura 2.12 A, a corrente catódica para o biomarcador aumentou até a concentração de 10 µg mL⁻¹ para anti-COX-2, para concentrações maiores não houve um ganho significativo na resposta do imunoensaio. Para o Tp53, figura 2.12 B, verifica-se que em concentrações acima de 5,0 µg mL⁻¹ a resposta analítica tornou-se constante. O sinal do branco está relacionado à adsorção não específica das PMs na superfície do eletrodo, sendo assim, adicionou-se PBS-T20 e BSA as dispersões contendo o biconjugado com

analito a fim de minimizar este efeito ⁷⁶. A melhor concentração foi selecionada de acordo com a maior diferença do sinal transiente de corrente obtida entre a detecção das soluções contendo as proteínas COX-2 e Tp53 em comparação com o branco. Para ambos os biomarcadores, a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi selecionada para os demais estudos.

Além disso, o tempo de reação de afinidade entre os biomarcadores e Ab_2 também foi avaliado no intervalo de 20 a 60 minutos. Este é um importante parâmetro para evitar reações de afinidade pouco eficientes (tempos curtos) ou dissociação entre os biomarcadores e Ab_2 (tempos longos) ¹¹⁵. Uma vez que alterações na temperatura durante os ensaios podem afetar a atividade das proteínas influenciando na especificidade e eficiência do imunossensor, a temperatura de reação foi cuidadosamente selecionada e controlada com base em dados previamente estabelecidos na literatura. Desta forma, uma temperatura ótima de imunorreação de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ foi selecionada para a interação entre os biomarcadores Tp53 e COX-2 e o bioconjugado formado pelas PMs decoradas Ab_2 e HRP ^{93,116–118}. Na figura 2.13 são apresentados os estudos do tempo de captura para ambos os biomarcadores.

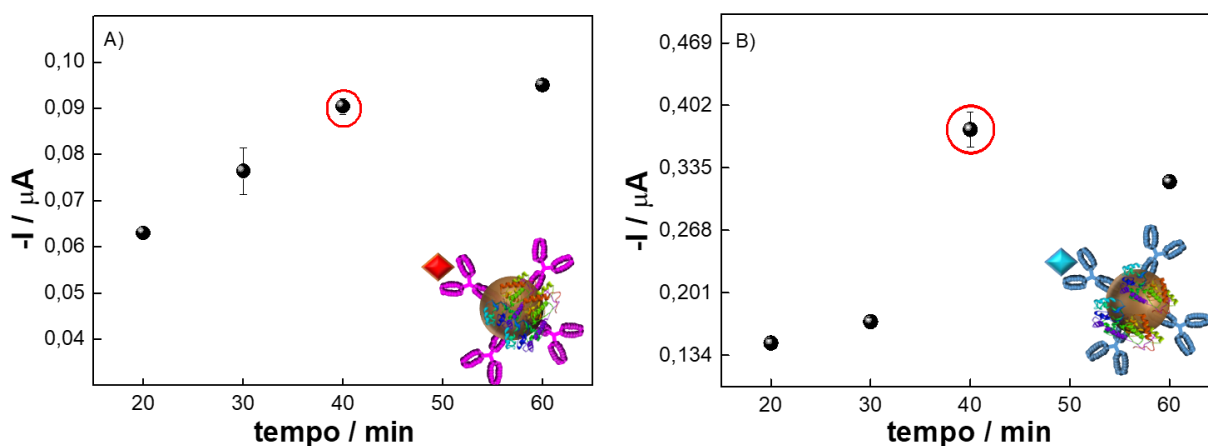


FIGURA 2.13 – Otimização do tempo de captura dos biomarcadores A) COX-2 e B) Tp53 com $\text{Ab}_2\text{-MB-HRP}$. Foi utilizado $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ab_1 e 10 pg mL^{-1} dos biomarcadores, $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Os sinais transientes de corrente foram registrados em potencial fixo $-0,2 \text{ V}$.

A figura 2.13 ilustra as respostas de corrente catódica obtidas para os biomarcadores em função do aumento do tempo de interação entre a $\text{Ab}_2\text{-PM-HRP}$ e COX-2 (A) e Tp53 (B). Como resultado, observou-se um aumento de sinal de corrente catódica até 40 minutos para ambos os biomarcadores. Para tempos superiores a 40 minutos, ocorreu uma saturação do sinal analítico para o COX-2,

consequentemente o mesmo manteve-se constante, enquanto para o Tp53 ocorreu o decréscimo de corrente catódica que pode estar associado a dissociação entre o Tp53 e Ab₂ para tempos longos. Portanto, para as próximas etapas, o tempo de 40 minutos foi escolhido para a etapa de interação para ambos biomarcadores.

2.3.4 - Curva de calibração para os biomarcadores estudados

Em condições otimizadas, o desempenho do imunoenensaio para detecção multiplexada de COX-2 e TP53 foi avaliado frente a diferentes concentrações destes biomarcadores. Para este propósito, foram utilizadas, na etapa de captura, soluções de PBS pH 7,4 fortificadas com as seguintes concentrações de COX-2: 0,0; 10,0; 20,0; 312,5; 1.250; 2.500; 10.000 e 50.000 fg mL⁻¹; e de Tp53: 0,0; 20,0; 40,0; 312,5; 1250; 2500; 5.000 e 10.000 fg mL⁻¹. Utilizou-se um novo dispositivo descartável para a medição em cada diferente concentração dos biomarcadores, no qual a dispersão dos biomarcadores, previamente capturados em um mesmo microtubo de 2,0 mL pelo seu respectivo bioconjugado (Ab₂-PM-HRP), foi injetada no canal microfluídico seguido pela detecção amperométrica conforme descrito na seções 2.2.4 e 2.2.5. A figura 2.14 apresenta as respostas transientes de corrente obtidas neste estudo. Os sinais transientes de corrente foram monitorados durante o processo de injeção de uma solução contendo H₂O₂ 0,1 mmol L⁻¹ e HQ 1,0 mmol L⁻¹ no sistema microfluídico com solução carregadora de PBS-TW20 pH 6,5.

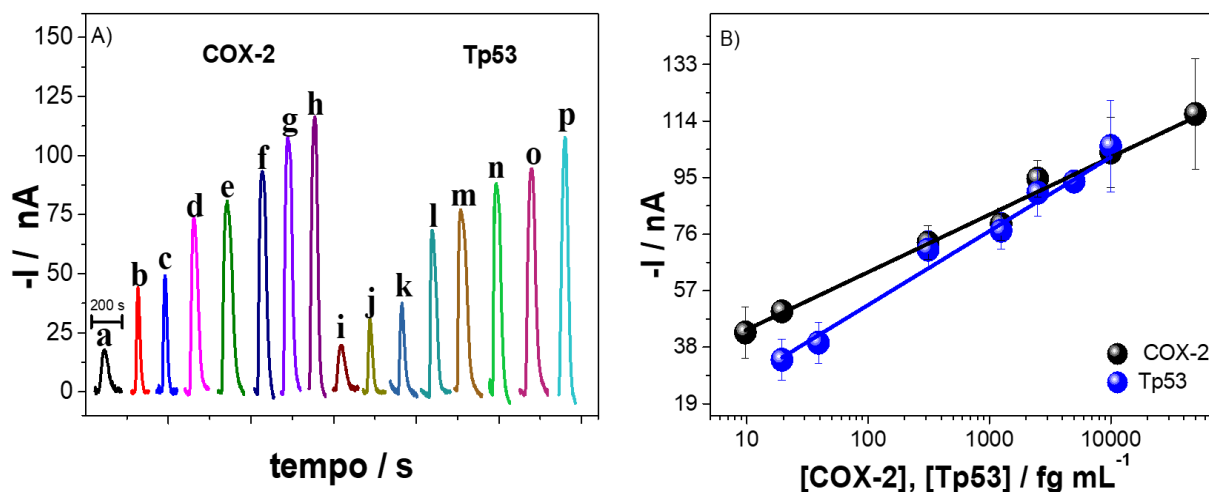


FIGURA 2.14 – A) Respostas amperométricas para soluções padrões de COX-2 (a- branco; b-h:10- 50.000 fg mL^{-1} e Tp53 (i- branco; j-p: 20- 10.000). B) Curva analítica para COX-2 (preta) e Tp53 (azul). Os parâmetros utilizados foram 40 minutos de tempo de magneto-captura e 30 minutos para a formação do imunossensor do tipo sanduíche, solução de detecção contendo 0,1 mmol L^{-1} de HQ e 1,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 .

Na figura 2.14 A são apresentados os sinais transientes de correntes, para ambos os biomarcadores em cada concentração estudada. Ao analisar a figura 2.14 B, pode-se observar um incremento linear na corrente catódica em função do logaritmo da concentração dos biomarcadores. O aumento linear nos valores de corrente catódica evidencia a viabilidade da determinação simultânea de COX-2 e Tp53, de forma que tanto a etapa de captura e separação dos biomarcadores quanto a detecção eletroquímica via imunensaio do tipo sanduíche foram realizadas efetivamente pelo método proposto. A faixa de trabalho foi estudada no intervalo de concentração entre 10 a 50.000 fg mL^{-1} e de 20 a 10.000 fg mL^{-1} para COX-2 e Tp53, respectivamente.

A partir dos resultados foram obtidas as equações $\Delta I \text{ (nA)} = 314,2 + 19,3 \log [\text{COX-2}]$ e $\Delta I \text{ (nA)} = 374,9 + 24,8 \log [\text{Tp53}]$ com coeficientes de correlação de 0,990 e 0,993 para COX-2 e Tp53 respectivamente. Os limites de detecção (LD) foram calculados seguindo a recomendação da IUPAC¹¹⁹:

$$LD = \frac{3 DP}{\text{sensibilidade}} \quad (2.4)$$

onde, DP é o desvio padrão referente a 10 medidas do branco e sensibilidade é inclinação da reta referente à curva analítica obtida. Os LDs extremamente baixos de 0,23 fg mL⁻¹ para COX-2 e 0,18 fg mL⁻¹ para Tp53 foram obtidos.

Os baixos limites alcançados pelo método podem ser justificados devido a vários fatores como as AuNPs que permitiram a imobilização eficiente dos anticorpos monoclonais nos 8-ET, além de proporcionar uma alta área superficial e imobilização estável de biomoléculas devido à presença de grupos carboxílicos^{73,120,121}. Outro fator que influenciou positivamente na eficiência do imunossensor foi o uso de PMs que permitiram além das vantagens citadas anteriormente, a captura e separação dos biomarcadores de maneira adequada evitando a ação de interferentes da matriz, como também a pré-concentração dos biomarcadores e amplificação do sinal analítico devido a elevada quantidade de HRP imobilizada na superfície das PMs^{87,122}. É importante ressaltar que o uso de anticorpos monoclonais e policlonais específicos para cada biomarcador em estudo permitiu obter respostas com elevada seletividade e sensibilidade¹²³.

O imunoensaio sanduíche proposto combinou a presença de nanocompostos com PMs, ocasionando um efeito sinérgico e consequente amplificação do sinal analítico. É importante notar que este efeito permitiu a determinação de COX-2 e Tp53 com ultrabaixos limites de detecção. A fim de comparar os LDs encontrados, foi listado na tabela 2.1 diferentes trabalhos da literatura reportando a detecção dos biomarcadores proposto baseados no uso de diferentes técnicas.

TABELA 2.1 – Relação de trabalhos da literatura para detecção dos biomarcadores COX-2 e Tp53 utilizando diferentes métodos e comparação com os resultados obtidos por este trabalho.

Biomarcador	Plataforma	Técnica	Faixa linear (fg mL⁻¹)	LD (fg mL⁻¹)	Ref.
COX-2	Au	SPR	3,64×10 ² -3,64×10 ⁸	1,35×10 ²	124
	Capilar/ APTES	UPAC	7,46×10 ² -7,46×10 ⁷	1,02×10 ²	
	UPD-Ag	CV	3,64 - 3,64×10 ⁵	2,5×10 ¹	125
	Au/MPA	AMP	(0,1 - 0,5)×10 ⁹	9,5 ×10 ⁷	126
	SPE/PDDA/AuNPs	AMP	10 - 5,0×10 ⁴	2,3×10 ⁻¹	Este trabalho
TP53	SPE/PM/Ab/p53/ Ab-HRP	AMP	(5,0 – 150)×10 ⁶	1,29×10 ⁶	127
	G/ oleamida	AMP	(3,66 - 91,4)×10 ⁶	3,6×10 ³	128
	SPE/PM/NS/PCN	ASV	(0,02 – 20)×10 ⁶	1,0×10 ⁴	129
	SPE/PDDA/AuNPs	AMP	20 – 1,0×10 ⁴	1,8×10 ⁻¹	Este trabalho

APTES - 3-aminopropiltriétoxissilano; UPD-Ag – *immobilization of underpotential deposition of silver* (Eletrodeposição de prata em potenciais menos negativos); MPA - 3- mercaptopropiônico; G – grafite; NS – *nanosphere* (nanoesferas); PCN - protein cage nanoparticles; SPR - *surface plasmon resonance* (Ressonância plasmônica de superfície); UPAC- *ultra-sensitive portable capillary* (sensores de fluorescência capilares); CV – *cyclic voltammetry* (voltametria cíclica); AMP – amperometria; ASV – *anodic stripping voltammetry* (voltametria de redissolução anódica).

Noah et al. descreveu a detecção da enzima ciclooxigenase- 2 utilizando duas técnicas distintas, ressonância plasmônica de superfície e sensores de fluorescência capilares, apesar da ampla faixa de detecção desta proteína por ambas as técnicas, as mesmas apresentam alto custo quando comparadas ao método proposto. Vale ressaltar que SPR é limitada ao uso de laboratórios centralizados, dificultando a portabilidade e análises *point-of-care*, além de elevado tempo de análise, etapa de detecção em torno de 30 minutos. Já UPAC apesar de serem mais simples que SPR, facilitando a portabilidade e tempo de análise de 5 minutos, esta técnica quando comparada ao imunensaio proposto limita-se a uma análise por medida enquanto que o nosso dispositivo pode realizar 4 replicatas para cada proteína em uma única análise ¹²⁴.

Omole e colaboradores desenvolveu um imunossensor amperométrico para detecção de COX-2 como biomarcador indicativo de dor utilizando eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizadas. Apesar do limite de detecção ser na ordem de ng mL^{-1} , este imunossensor apresenta desvantagens como a necessidade da limpeza da superfície do eletrodo de ouro com polimento em alumina, solução piranha (uma mistura 3: 1 [v/v] de H_2SO_4 e H_2O_2 em temperatura ambiente por 20 min), além da etapa adicional de condicionamento por tratamento eletroquímico de oxidação/redução (-0,3 a +1,5 V vs. $\text{Ag} | \text{AgCl}$) em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4). ¹²⁶. Outro imunossensor voltamétrico foi descrito por Noah e colaboradores aborda a quantificação deste biomarcador com a utilização de um filme de prata depositado sobre um cristal de quartzo a base de ouro, os íons de prata serviram como sonda redox. Após essa etapa há a necessidade do pré-tratamento da superfície para que a mesma seja viável para ancorar proteína G e o anticorpo anti-COX-2 ¹²⁵. Ambos os métodos eletroquímicos citados acima tornar as análises dispendiosas, morosas e dificultam a miniaturização do sistema para análise no ponto de atendimento, como também são limitados uma análise por vez.

A detecção eletroquímica de Tp53 tem sido reportada na literatura. A amplificação do sinal analítico com o uso de PMs foi abordada em dois trabalhos apresentados na tabela 2.1. Chen e colaboradores obtiveram elevada sensibilidade devido ao uso de PMs, nanoesferas de carbono e PCN metálicos para o ancoramento dos anticorpos e da proteína p53, e faixa linear de pg a ng mL^{-1} para um imunossensor livre de enzimas ¹²⁹. Porém este método também é limitado a detecção de um biomarcador e uma análise por vez. Outro trabalho foi abordado por Pedrero et. al.,

no qual a detecção amperométrica deste biomarcador utilizando magneto imunossensor do tipo sanduíche sobre a superfície das partículas magnéticas com a utilização de anticorpos monoclonais e policlonais marcados com HRP. Este trabalho usa eletrodos impressos comerciais de carbono e também é limitado a uma única resposta analítica por vez ¹²⁷.

Em suma, na tabela 2.1 pode-se observar que os valores de LD obtidos no presente trabalho foram os menores reportados até o momento. Outros trabalhos, mesmo usando PMs, mostraram valores de LD cerca de 1000 vezes maior para a quantificação de Tp53 ^{127,129}. Para o COX-2, a maioria dos trabalhos relatados na literatura envolvem a detecção do biomarcador para casos de indicativo de dor, e os LD apresentados foram maiores aos obtidos utilizando o imunoensaio desenvolvido. Vale ressaltar também que este trabalho é o primeiro dispositivo eletroquímico descartável utilizando plataforma microfluídica e com detecção multiplexada para a quantificação de COX-2 e Tp53. Quando comparado com os métodos estabelecidos na literatura, para a detecção destes biomarcadores, o presente procedimento apresenta o menor tempo de análise, cerca de uma hora, incluindo as etapas de incubação e a detecção eletroquímica dos biomarcadores. Além disto, o bioconjugado Ab₂-MB-HRP preparado apresentou estabilidade por até 3 semanas. O imunoensaio desenvolvido mostrou-se de baixo custo e fácil fabricação associados ao uso da técnica de serigrafia e sistemas microfluídicos, como também permite a análise de quatro replicatas para cada biomarcador em estudo.

Para demonstrar a eficiência do imunossensor proposto, a repetibilidade também foi avaliada utilizando soluções padrão de COX-2 e Tp53 diluídas em PBS. O primeiro estudo foi realizado avaliando os sinais amperométricos obtidos de cada eletrodo em um mesmo arranjo (estudo intra-arranjo), utilizando as concentrações de 10 e 20 fg mL⁻¹ para COX-2 e Tp53, respectivamente. Este estudo foi realizado em triplicata e o imunossensor proposto apresentou boa repetibilidade, com um desvio padrão relativo (DPR) de 5,7% para COX-2 e 6,5% para Tp53, indicando a boa precisão do procedimento proposto. A repetibilidade também foi avaliada em diferentes arranjos (inter-arranjos, n = 3 com 8-ET cada), no qual o DPR foi de 2,7% para COX-2 e 6,4% para Tp53. Portanto, a excelente repetibilidade do método confirma não apenas o desempenho do imunoensaio proposto como também todas as etapas envolvidas na construção do dispositivo descartável, como a técnica de serigrafia para a fabricação dos eletrodos, delimitação da área dos 8-ET e a

construção da célula microfluídica, bem como a síntese das AuNPs e a modificação das PMs com Ab₂ e HRP.

O estudo da interferência cruzada, conhecido como *cross-talking*, devido a proximidade entre os eletrodos na detecção simultânea dos biomarcadores COX-2 e Tp53, foi realizado comparando os resultados obtidos pelo imunoenensaio multiplexado com a resposta do imunoenensaio individual em soluções padrão de COX-2 e Tp53 diluídas em PBS (pH 7,4). A faixa linear, sensibilidade da curva analítica e os limites de detecção encontrados estão apresentados na tabela 2.2.

TABELA 2.2 – Resultados obtidos neste trabalho para imunoenensaio com detecção individual e multiplexada dos biomarcadores COX-2 e Tp53.

IMUNOSENSOR	FAIXA LINEAR (fg mL⁻¹)	SENSIBILIDADE (nA fg⁻¹mL)	LIMITE DE DETECÇÃO (fg mL⁻¹)
COX-2	20 – 5,0×10 ⁴	17,0	0,35
Tp53	10 - 5,0×10 ³	32,0	0,69
Multiplex COX-2	10 - 5,0×10 ⁴	19,3	0,23
Multiplex Tp53	20 - 1,0×10 ⁴	24,8	0,18

Como pode-se observar na tabela 2.2, a determinação das proteínas COX-2 e Tp53 podem ser realizadas tanto individualmente, quanto em conjunto, visto que não há variação significativa entre os parâmetros estudados como faixa linear, sensibilidade da curva analítica e limites de detecção. Sendo assim, o tamanho e a distância dos eletrodos estão apropriados para a determinação destes biomarcadores simultaneamente em amostras de pacientes com câncer pelo método proposto, não ocorrendo interferência de sinais transientes de corrente captadas pelos eletrodos vizinhos.

2.3.5 - Aplicação do imunoensaio multiplexado para detecção dos biomarcadores COX-2 e Tp53 em amostras de soro de pacientes com CC e CE

A fim de ratificar o potencial da aplicabilidade e a exatidão do imunoensaio descartável proposto, o mesmo foi utilizado na quantificação simultânea de COX-2 e TP53 em amostras de pacientes com CC e CE e os resultados obtidos foram comparados com o método de ELISA. Para isto, as amostras de pacientes foram previamente diluídas em PBS 7,4, seguindo a proporção de 1:1.000.000 para serem quantificadas pelo imunoensaio multiplexado proposto. Assim uma alíquota de 500 μL foi usada na etapa de incubação com os bioconjugados ($\text{Ab}_2\text{-MB-HRP}$) de ambos os biomarcadores. A figura 2.15 apresenta a comparação entre o método proposto e ELISA para a quantificação dos biomarcadores COX-2 e Tp53 em amostras de pacientes com câncer endometrial e cervical.

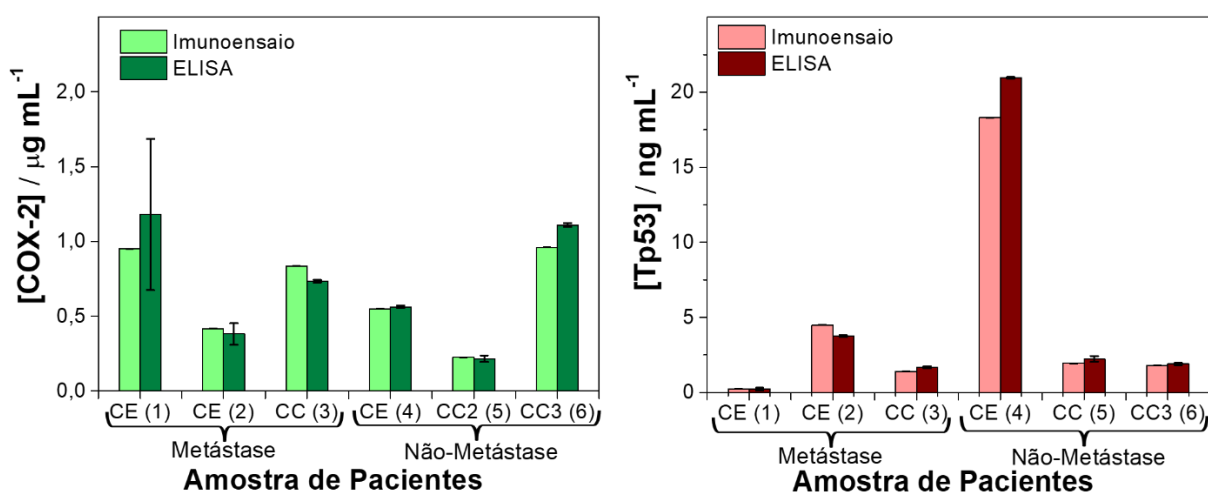


FIGURA 2.15 – Aplicação do imunoensaio desenvolvido e do método comparativo ELISA para detecção das proteínas COX-2 e Tp53 em seis amostras de pacientes com câncer endometrial (CE) e câncer cervical (CC) na ausência e presença de metástase.

As seis amostras de pacientes foram analisadas e divididas por tipo de câncer (endometrial e cervical) e se o paciente se encontrava em metástase ou não pelo Hospital de Amor de Barretos. Para o biomarcador COX-2 os resultados não evidenciaram diferença significativa entre os pacientes que apresentaram metástase ou não, no entanto, deve-se levar em conta que o número de voluntários é muito

pequeno. Nas amostras, a concentração de COX-2 variou entre 0,2 a 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sendo que as concentrações foram elevadas nos 6 pacientes com CC e CE, em comparação com pacientes normais relatados na literatura ($\sim 0,5 \text{ ng mL}^{-1}$), sugerindo o papel regulatório do COX-2 no desenvolvimento destas lesões malignas, sendo também este biomarcador um potencial alvo farmacológico para agentes quimioterápicos para CC e CE ^{125,130–134}.

O Tp53 apresentou uma diferença significativa entre as três amostras analisadas no CE quando se compara os estágios metastático em um intervalo de 0,2 - 4,0 ng mL^{-1} , com o paciente que apresenta o câncer localizado na região do endométrio com valor aproximado 21 ng mL^{-1} . Enquanto que, para pacientes com CC a concentração de Tp53 apresentou-se próxima para os três pacientes em estudo variando de 1,7 a 2,3 ng mL^{-1} . Os desvios padrões apresentados tanto para o método ELISA quanto para o imunoensaio foram baixos, menores que 2%. Na literatura, estudos quantitativos da proteína Tp53 ainda são muito pouco explorados, encontrando-se relatado trabalhos da presença dessa oncoproteína semi-quantitativamente ou qualitativamente em amostras de soro de paciente ou em lisado de células. Porém vale ressaltar que muito tem sido estudado na relação da diminuição da expressão desta proteína em pacientes com câncer quando comparados com indivíduos saudáveis, devido o papel desempenhado da Tp53 no ciclo celular ^{128,135}.

Ao analisar a figura 2.15, pode-se observar que o método proposto apresentou excelente concordância e exatidão quando comparado ao método ELISA. O teste *t-student* pareado para um grau de liberdade igual a cinco e nível de confiança de 95%, apresentou-se o $t_{\text{calculado}}$ para COX-2 (0,80) e Tp53 (0,90) menor que o $t_{\text{crítico}}$ (2,0 para ambos biomarcadores), demonstrando que os resultados apresentados por ambos os métodos não apresentaram diferença estatística significativa.

2.4 - CONCLUSÕES

O imunoensaio proposto permitiu a detecção multiplexada dos biomarcadores COX-2 e Tp53, combinando o baixo custo inerentes da utilização da técnica de serigrafia, em conjunto aos volumes reduzidos de reagentes e amostras utilizados decorrentes de sistemas microfluídicos. Os dispositivos desenvolvidos tiveram um custo aproximado de R\$ 0,50 por dispositivo com relação ao material e reagentes

utilizados na sua construção, enquanto que o ELISA custa aproximadamente R\$ 50,00 por análise.

O método desenvolvido neste trabalho apresentou um potencial interessante de aplicabilidade para detecção de um painel de biomarcadores para CC e CE que podem auxiliar não apenas no diagnóstico como também no prognóstico destas doenças, principalmente o Tp53 que está relacionado diretamente com o ciclo celular, chamado “guardião celular”. O COX-2 é de suma importância, principalmente, com o propósito de avaliação terapêutica de radioterapia e quimioterapia, visto que muitos trabalhos reportados na literatura demonstram sua conexão direta com o grau de malignidade.

O imunoensaio eletroquímico apresentou-se viável, sensível e seletivo na determinação simultânea das proteínas COX-2 e Tp53 sem apresentar o efeito de interferência cruzada entre elas, devido a não variação significativa dos parâmetros faixa linear, sensibilidade e limite de detecção quando comparados com os imunoensaios com quantificação individual destes biomarcadores. A exatidão do imunoensaio proposto foi confirmada pela boa concordância e correlação dos resultados obtidos na quantificação deste biomarcadores em amostras de soro de pacientes com CC e CE quando comparado os mesmos com o método de ELISA. Os limites de detecção obtidos foram os mais baixos reportados até o momento para a determinação destes biomarcadores $0,23 \text{ fg mL}^{-1}$ e $0,18 \text{ fg mL}^{-1}$ para COX-2 e Tp53, respectivamente.

O método proposto apresenta-se como uma ferramenta promissora para a quantificação de um painel de biomarcadores, visto que apresenta vantagens frente ao método ELISA como: baixo custo, baixo consumo de amostras e reagentes, fácil construção e instrumentação simples, rapidez nas análises e detecção multiplexada de até 8 biomarcadores simultaneamente, que pode vir a viabilizar um diagnóstico precoce e exato, como também a triagem e direcionamento adequado nos tratamentos terapêuticos para casos de CC e CE.

CAPÍTULO - 3

Desenvolvimento de um imunoenensaio multiplexado para determinação dos biomarcadores p16 e Tp53 em amostras de pacientes com câncer cervical e endometrial

O segundo método proposto objetivou avaliar a detecção simultânea das proteínas p16 e Tp53 em pacientes com CC e CE por meio de um dispositivo eletroquímico que combinou a versatilidade da técnica de impressão por jato de tinta para a fabricação de um arranjo com 8 eletrodos trabalho a base de ouro, com a simplicidade da técnica de serigrafia para o contra- eletrodo e para o eletrodo de pseudo-referência, conferindo a descartabilidade total da célula microfluídica. O imunoenensaio eletroquímico do tipo sanduíche foi construído com o uso monocamadas auto-organizadas sobre a superfície dos 8-ET à base de ouro para a imobilização dos Ab₁ na superfície, em conjunto com os biomarcadores capturados pelas PMs decoradas com Ab₂ e HRP.

3.1 - MATERIAIS UTILIZADOS

Os reagentes N-metil-2-pirrolidona, poli(ácido âmico), 1-doceanotiol e brometo de amônio de tetraoctilo foram adquiridos através da Sigma–Aldrich (San Luis, Estados Unidos). Os reagentes tolueno e etanol foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O anticorpo policlonal e monoclonal (anti-p16), anticorpo policlonal marcado com a enzima peroxidase (anti-p16-HRP) e o peptídeo p16 foram adquiridos da Imuny Biotechnology (Campinas, São Paulo). Os demais reagentes já foram listados no capítulo anterior.

Os eletrodos de trabalho a base de ouro foram impressos com auxílio de uma impressora a jato de tinta marca Dimatix (modelo DMP-2850) adquiridos da Fujifilm (EUA).

3.2 - PARTE EXPERIMENTAL

3.2.2 - Fabricação dos eletrodos descartáveis

3.2.2.1 - Fabricação dos eletrodos de trabalho por impressão à jato de tinta

As AuNPs utilizadas na impressão por jato de tinta foram sintetizadas seguindo o protocolo previamente reportado por Jensen *et al.* ¹³⁶. A fabricação dos 8-ET foi realizada na University of Connecticut e sua aplicação foi realizada na UFSCar. Para isso, em um balão de fundo redondo de 500 mL adicionou-se 160 mL

de tolueno e 3,0 g de brometo de amônio de tetraoctilo e, 35 mL de $0,08 \text{ mmol L}^{-1}$ de uma solução de ácido tetracloroaurato (III) hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$). Agitou-se por 10 minutos a solução com o auxílio de um agitador magnético, certificando-se que as duas fases se misturassem. Em seguida, removeu-se a fase aquosa com o auxílio de uma pipeta pasteur em vidro e se adicionou $87,6 \mu\text{L}$ de 1-dodecanotiol e manteve agitação constante por 10 minutos. Depois disso, 40 mL de uma solução aquosa de $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaBH}_4$ foi adicionada e mantida sob agitação por três horas. A fase aquosa foi removida novamente com o auxílio de uma pipeta pasteur em vidro, seguida por três etapas de lavagem sucessivas com 30 mL de água, com a remoção da fase aquosa todas as vezes. O balão de fundo redondo foi acoplado a um rotoevaporador à pressão reduzida e à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ para evaporação do tolueno. Em seguida, adicionou-se ao balão 30 mL de etanol e a solução foi mantida em banho de ultrassom por 10 segundos. A solução resultante foi filtrada à vácuo com um papel filtro de PTFE (politetrafluoretileno) de $0,2 \mu\text{m}$ e as nanopartículas lavadas com 30 mL de etanol e 150 mL de água. O papel filtro foi transferido para uma placa petri recoberta com papel alumínio e as nanopartículas foram secas em dessecador por 24 horas. A tinta contendo AuNPs foi preparada com a dissolução das AuNPs obtidas em tolueno de modo a se obter uma concentração de 100 mg mL^{-1} ($d = 0,867 \text{ g mL}^{-1}$). Com o auxílio de uma seringa de vidro $1,5 \text{ mL}$ da tinta de AuNPs foram inseridas no cartucho da impressora Dimatix utilizada para a impressão dos eletrodos.

A figura 3.1 ilustra as etapas para a confecção dos 8-ET a base de ouro:

- **Etapas 1** – Para impressão, folhas de poliimida (Kapton) de $22 \times 28 \text{ cm}$ foram limpas com etanol e água e secas com nitrogênio antes de serem colocadas na impressora. Os formatos dos 8-ET previamente (área geométrica de $0,3 \text{ mm}^2$) foram criados e selecionados no *software*, de modo a imprimir vários conjuntos de eletrodos em um mesmo substrato. Definiu-se o espaçamento entre gotas como $15 \mu\text{m}$ entre cada pixel, tornando viável a sobreposição à medida que cada gota se espalha para um diâmetro aproximado de $40 \mu\text{m}$. O padrão dos 8-ET foi definido para imprimir cada eletrodo de trabalho nas dimensões de um quadrado com área geométrica de aproximadamente $0,3 \pm 0,015 \text{ mm}^2$. Para cada matriz de oito eletrodos, aproximadamente $600 \mu\text{g}$ de ouro foram impressos. Quando impressa, a tinta de nanopartícula de ouro se espalhou como esperado

- **Etapa 2** – Uma vez impressos, os arranjos de eletrodos foram aquecidos a 200 °C por 3 minutos. Isso permitiu que as AuNPs coalescessem formando caminhos de percolação ⁸².
- **Etapa 3** – As folhas foram então devolvidas à impressora pela última vez para depositar a camada isolante utilizando tinta de poli(ácido âmico) (PAA). Uma solução de 1,0 % (m/m) de PAA foi preparada utilizando N-metil-2-pirrolidona (NMP) como solvente. Cinco camadas de tinta PAA foram aplicadas sobre as derivações das matrizes de 8-ET.
- **Etapa 4** – Uma vez que as camadas de isolamento foram depositadas, as folhas foram aquecidas por 15 minutos a 200 °C.

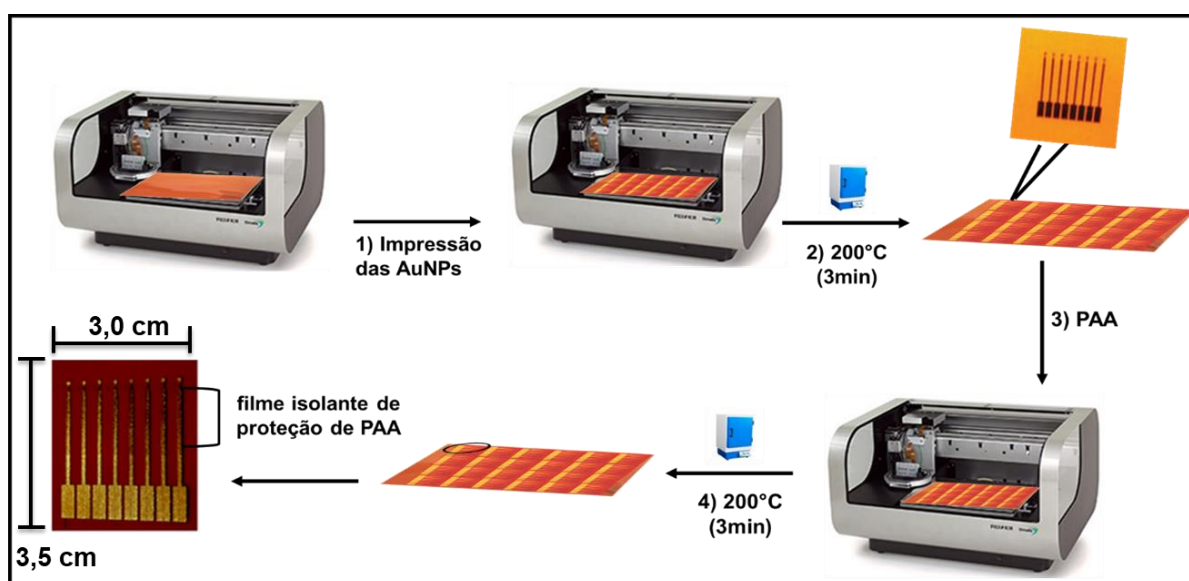


FIGURA 3.1 – Representação esquemática da fabricação dos 8-ET à base de tinta de AuNPs por impressão à jato de tinta.

3.2.2.2 - Fabricação dos eletrodos de referência e contra eletrodos pela técnica de serigrafia.

Os eletrodos de referência e auxiliar foram construídos de forma similar a descrita no capítulo 2, seção 2.2.1, diferindo apenas as dimensões dos eletrodos, que foram fabricados com uma área de 0,48 cm² para o contra- eletrodo e, 0,21 cm² para o eletrodo de referência. Essas dimensões foram adaptadas para que o tamanho dos eletrodos fosse adequado para a construção da célula microfluídica juntamente com os 8-ET de ouro.

3.2.2 - Modificação do arranjo de 8-ET à base de ouro com monocamadas auto-organizadas e Ab₁

O procedimento adotado para a modificação da superfície dos eletrodos de ouro com grupos carboxílicos foi semelhante ao reportado por Jesen e colaboradores com algumas modificações e é apresentado na figura 3.2 ¹³⁶.

Antes da etapa de modificação, os 8-ET foram pré-tratados eletroquimicamente em 0,18 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico pela técnica de voltametria cíclica em uma janela de potencial de -0,5 a 1,5 V vs. Ag | AgCl a uma velocidade de 100 mV s⁻¹ durante 10 ciclos a fim de promover a limpeza dos eletrodos e o cálculo da área eletroativa de cada eletrodo de trabalho. Depois disso os eletrodos foram então lavados com água, etanol e finalmente imersos em 4,0 mmol L⁻¹ de ácido 3- mercaptopropiônico (MPA) em etanol durante 24 horas. Esta etapa foi realizada a fim de garantir a eficiência da modificação dos eletrodos por monocamadas auto- organizadas, visto que o grupo do tiol contendo o enxofre liga-se covalentemente ao Au e as forças intermoleculares entre a cadeia principal de carbono promovem a auto-organização das camadas e, conseqüentemente o grupo funcional ácido carboxílico fica exposto para a interação com os anticorpos. Os 8-ET/SAM foram removidos e lavados com etanol e água e secos sob fluxo de gás nitrogênio.

Para a imobilização do anticorpo, o grupo carboxílico presente no MPA foi ativado com a adição de 3 μL de EDC/NHS (0,4 e 0,1 mol L⁻¹, respectivamente) sobre os 8-ET e mantida por 10 minutos. Em seguida, os eletrodos foram lavados com água e se adicionou 3 μL de Ab₁ anti-p16 em quatro eletrodos e Ab₁ anti-Tp53 nos quatro eletrodos restantes. A concentração de Ab₁ foi otimizada, para assegurar melhor eficiência ao imunossensor. Os 8-ET contendo os Ab₁ foram mantidos à 4 °C por 18 horas, para que a reação de amidização ocorresse de forma efetiva. Os eletrodos foram lavados com PBS (pH 7,4) e tratados por uma hora com 3 μL de BSA 2,0% (m/v) em PBS, pH 7,4, para auxiliar no bloqueio de ligações não específicas. Os 8-ET/SAM/Ab₁ foi mantido a 4°C até a sua utilização.

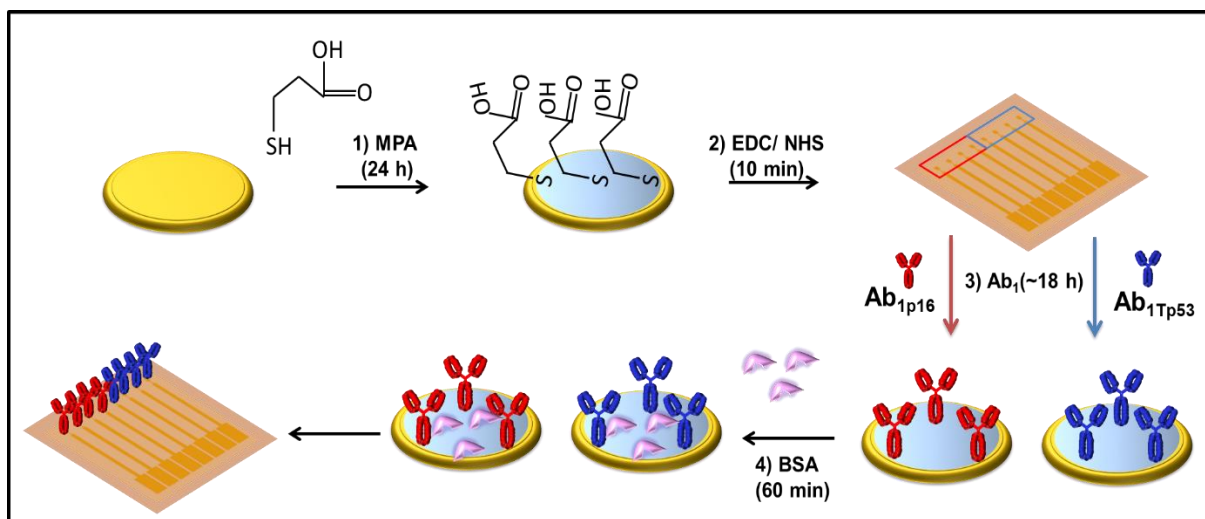


FIGURA 3.2 – Representação esquemática da modificação dos 8-ET à base de AuNPs com monocamadas auto-organizadas com MPA e ancoragem dos Ab₁ anti-p16 e anti-Tp53.

Os 8-ET foram lavados com PBS-T20, pH 7,4 e posicionados sobre um cartão adesivo dupla face para a formação da célula microfluídica em conjunto com o eletrodo de referência e contra-eletrodo. A célula microfluídica descartável formada foi acoplada ao sistema microfluídico de forma similar a descrita no primeiro trabalho com o auxílio de tubos PEEK que foram posicionados na entrada e saída do dispositivo com o auxílio de uma fita adesiva (3M). A figura 3.3 ilustra o sistema microfluídico, no qual a célula microfluídica foi inserida, e também apresenta os eletrodos construídos e que foram utilizados neste trabalho.

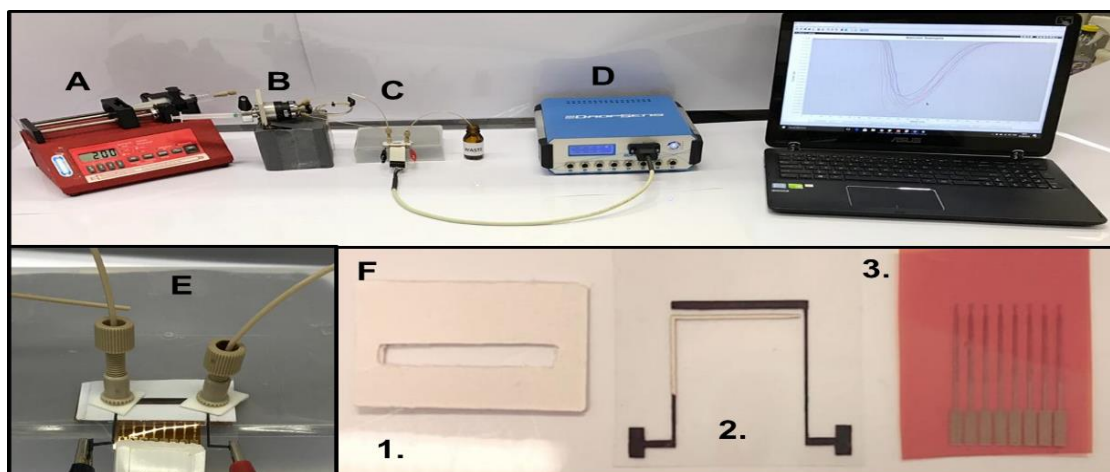


FIGURA 3.3 – Sistema microfluídico contendo bomba de seringa (A) com vazão de $200 \mu\text{L min}^{-1}$, válvula de injeção (B) conectada a célula microfluídica (C e E - zoom) contendo 8-ETs de ouro confeccionados pela técnica de impressão à jato de tinta (2), eletrodo de referência e contra-eletrodo (3) fabricados pela técnica de serigrafia e um cartão adesivo dupla face (1) contendo o canal microfluídico com dimensões: 30 mm de comprimento, 3,0 mm de largura e 0,3 mm de espessura (F). A célula microfluídica foi interfaceada a um multipotenciostato (D).

3.2.3 - Modificação das PMs com Ab_2 e HRP, captura e detecção eletroquímica dos biomarcadores p16 e Tp53

A etapa de formação do bioconjugado Ab_2 -PM-HRP foi realizado utilizando o mesmo procedimento descrito na seção 2.2.3. Os bioconjugados formados tanto para o biomarcador p16 quanto para o Tp53 foram adicionados em um microtubo contendo $320 \mu\text{L}$ das soluções padrão de ambos os biomarcadores ou as amostras de CC e CE, diluídas previamente em PBS (pH 7,4). O tempo de magneto-captura dos biomarcadores foi otimizado experimentalmente de forma a propiciar a interação destas proteínas com Ab_2 presente em seus respectivos bioconjugados. Após etapas de lavagem, separação magnética e pré-concentração dos biomarcadores, as PMs foram injetadas na célula microfluídica utilizando a válvula de injeção a uma vazão de $200 \mu\text{L min}^{-1}$ até preencher todo o canal, pausou-se a bomba de seringa e se manteve a solução em contato com os 8-ET/SAM/ Ab_1 por 30 minutos para a formação do imunossensor do tipo sanduíche. Após esta etapa, o canal microfluídico foi lavado a $200 \mu\text{L min}^{-1}$ durante 1 minuto com PBS-T20 (pH 6,5) contendo 0,1% (m/v) de BSA, a fim de assegurar que as PMs não ligadas fossem eliminadas. A etapa de detecção

eletroquímica foi baseada no ciclo catalítico da enzima HRP (como mencionado na seção 2.2.5), com a injeção de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 e o sinal analítico foi obtido pela técnica de amperometria com aplicação de um potencial de $-0,2 \text{ V}$ devido ao ciclo catalítico da enzima com a utilização do seu substrato e o mediador eletrônico. A figura 3.4 ilustra a etapa de captura, formação do imunossensor do tipo sanduíche e o mecanismo de detecção eletroquímica dos biomarcadores p16 e Tp53.

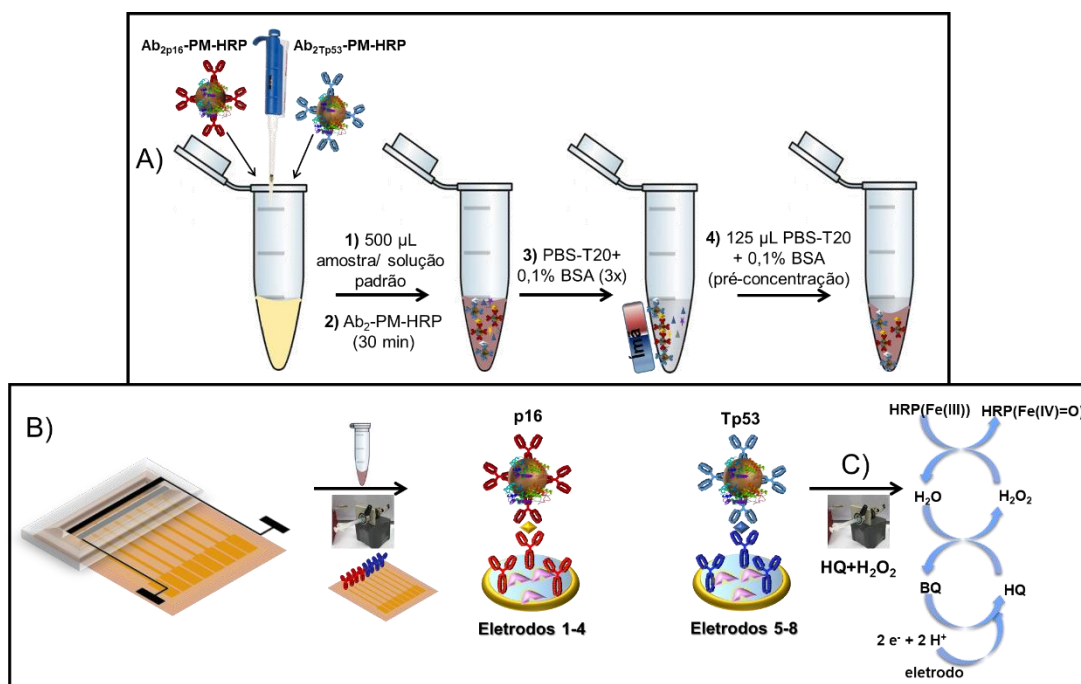


FIGURA 3.4 – Representação esquemática da etapa de A) magneto-imuno captura, B) formação do imunossensor do tipo sanduíche e C) mecanismo de detecção eletroquímica.

3.2.4 - Método comparativo ELISA

O método ELISA para o Tp53 procedeu conforme descrito no item 3.2.6. Enquanto que para o p16, seguiu-se o protocolo disponibilizado pelo fornecedor *Imuny Biotechnology*. Neste processo, uma placa ELISA da costar (modelo 3590, Corning Incorporated) foi sensibilizada com $50 \mu\text{L}$ de uma solução $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticorpo policlonal anti-p16 diluído em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão carbonato pH 9,6 e, incubada por 2 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Etapas de lavagem foram realizadas três vezes com $200 \mu\text{L}$ de PBS-T20. Após essas etapas, bloqueou-se a placa com $100 \mu\text{L}$ de uma solução de 2% (m/v) de BSA diluída em PBS pH 7,4 e a placa foi incubada por 1 hora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Lavou-se a placa três vezes com 200 μL com PBS-T20. Em seguida, alíquotas de 50 μL das amostras e das soluções padrão de p16 previamente diluídas em PBS 7,4 foram adicionadas aos poços e incubadas por 18 h. Etapas de lavagem foram realizadas três vezes com 200 μL de PBS-T20. Na sequência, 50 μL de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anticorpo policlonal anti-p16 marcado com a enzima HRP (diluído em PBS, pH 7,4) foi adicionado aos poços, e incubados a 37 °C por 3 horas. Etapas de lavagem foram realizadas três vezes, com posterior adição de 50 μL de TMB aos poços e incubação a 37 °C durante 15 minutos, tempo necessário para o surgimento da coloração azulada. Para finalizar uma alíquota de 50 μL da solução 0,2 mol L^{-1} de ácido clorídrico foi adicionado para cessar a reação. A leitura colorimétrica do produto gerado foi realizada a 450 nm pelo leitor de microplaca Labtec (LT4000). A análise das soluções padrão do peptídeo p16 e das amostras foi realizada em triplicata.

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 - Otimização dos parâmetros experimentais

A fim de garantir o desempenho ótimo do imunoenensaio proposto, estudou-se a influência da concentração do Ab_1 imobilizado na superfície dos 8-ET/SAM e o tempo de magneto-imuno captura envolvido na interação entre o anticorpo policlonal presente nos bioconjugados $\text{Ab}_2\text{-PM-HRP}$ com os biomarcadores p16 e Tp53, uma vez que estes fatores influenciam diretamente na reação de bioafinidade para formação de imunossensores do tipo sanduíche na superfície do transdutor à base de ouro. A figura 3.5 apresenta a otimização destes dois parâmetros experimentalmente.

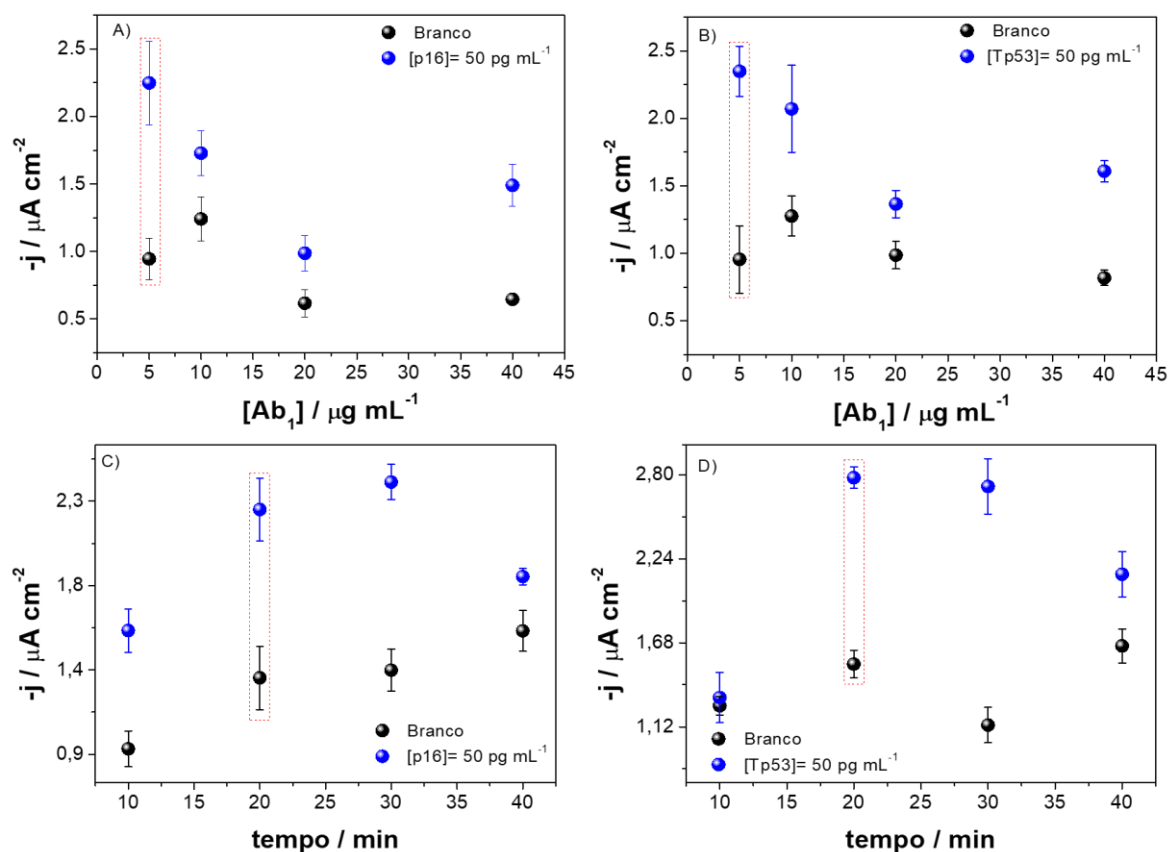


FIGURA 3.5 – Resposta de densidade de corrente obtidas em função da concentração de Ab_1 imobilizados sobre a superfície dos 8-ET/SAM é apresentada para A) p16 e B) Tp53 e tempo de magneto-imuno captura entre os bioconjugados $\text{Ab}_2\text{-MB-HRP}$ e os biomarcadores C) p16 e D) Tp53. Para cada concentração é apresentada a corrente do branco e a amostra. Concentração dos biomarcadores de 50 pg mL^{-1} , tempo de captura e de formação do sanduíche de 30 minutos. Solução de detecção contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

O efeito da concentração de Ab_1 para a detecção de p16 e TP53 sobre o sinal transiente de densidade de corrente catódica foi estudado entre $5,0$ a $40 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, mantendo-se constante a concentração dos biomarcadores em 50 pg mL^{-1} . Como observado na figura 3.5 A e B, uma concentração de $5 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ foi suficiente e apresentou melhor densidade de corrente frente às demais concentrações em estudo, quando se compara a diferença entre o sinal mensurado na presença dos biomarcadores com o sinal do branco. O sinal do branco está relacionado à adsorção não específica das PMs na superfície do 8-ET/SAM, sendo assim, adicionou-se PBS-T20 e BSA a solução contendo as PMs para minimizar este efeito ⁷⁶. É de suma importância evidenciar que estes anticorpos possuem alta afinidade pelas proteínas

de interesse, uma vez que baixas concentrações de Ab_1 e dos biomarcadores é suficiente para a formação do imunoenensaio. As concentrações ideais encontradas no imunoenensaio eletroquímico foram cerca de 50% menores às geralmente utilizadas pelo método ELISA.

Já no estudo referente ao tempo de magneto-imuno captura dos biomarcadores p16 e Tp53 (figura 3.5 C e D), pode-se observar que tempos de ensaios curtos são suficientes, cerca de 20 minutos, para que ocorra esta reação. Esse tempo é cerca de 75% menor aos utilizados na técnica de ELISA. Após este tempo evidenciou-se uma saturação do sinal até 30 minutos e, não houve um ganho significativo na resposta do imunoenensaio.

A influência da vazão utilizada para o carregamento da solução de detecção foi otimizada a fim de assegurar a melhor resposta amperométrica para o método proposto. A figura 3.6 ilustra as respostas de densidade de corrente transientes obtidas para cada biomarcador em estudo variando a vazão em 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ para a injeção da solução de detecção composta por 0,1 mmol L^{-1} de HQ e 1,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 . Este estudo foi realizado utilizando como a solução carregadora PBS-T20 contendo 0,1% de BSA, concentração de 50 pg mL^{-1} para p16 e Tp53, aplicando um potencial constante de -0,2V.

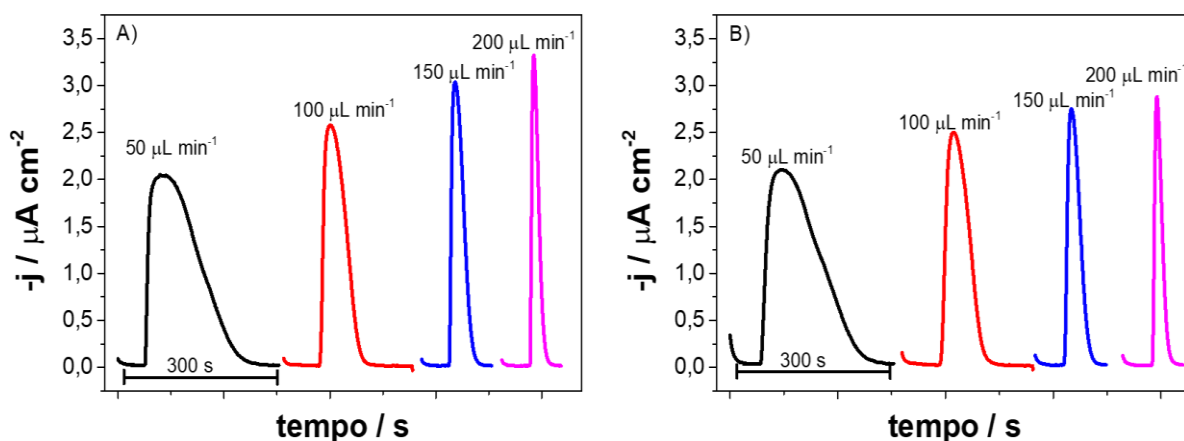


FIGURA 3.6 – Otimização da vazão da solução carregadora com a injeção de 1,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 e 0,1 mmol L^{-1} de HQ para a detecção de 50 pg mL^{-1} dos biomarcadores COX-2 e Tp53.

Como pode ser observado pela figura 3.6, o alargamento do sinal analítico está diretamente ligado à vazão utilizada para a injeção da solução de detecção, para taxas de fluxo baixas, o alargamento do pico é evidenciado devido ao maior tempo de

retenção da solução dentro do canal microfluídico, sendo necessários cerca pouco menos de 5 minutos a $50 \mu\text{L min}^{-1}$ para que o volume injetado de $100 \mu\text{L}$ da solução de H_2O_2 e HQ percorrer todo o dispositivo. A menor vazão também leva a valores menores de corrente devido ao menor transporte de massa quando comparado com vazões maiores. Sendo assim, a vazão de $50 \mu\text{L min}^{-1}$, apresentou além de menores valores de corrente, alargamento do pico e tempos longos quando comparado com as demais vazões. A vazão de $200 \mu\text{L min}^{-1}$ foi selecionada para os demais estudos, uma vez que apresentou melhor resolução dos picos em um curto período de análise de aproximadamente 2 minutos. Portanto, para o imunensaio proposto, o tempo total do ensaio incluiu a etapa de magneto-captura dos biomarcadores (20 min), formação do imunossensor sanduíche (30 min) e a detecção eletroquímica (2 min), resultando em um tempo total de 52 minutos para 8 análises simultâneas.

3.3.2 - Curva de calibração para os biomarcadores p16 e Tp53

Após a otimização das etapas envolvidas no desenvolvimento do imunossensor multiplexado para os biomarcadores p16 e Tp53 construíram-se as curvas de calibração utilizando soluções padrão. Para este estudo, foram utilizadas, na etapa de captura, as seguintes concentrações de p16: 0,0; 0,83; 2,5; 7,5; 22,5; 67,5; 7.300 pg mL^{-1} ; e de Tp53: 0,0; 4,5; 13,6; 40,0; 122; 370 e $89.000 \text{ pg mL}^{-1}$. Ambos os biomarcadores foram diluídos previamente em PBS (pH 7,4). Utilizou-se um novo dispositivo descartável para a medição em cada diferente concentração dos biomarcadores, no qual a dispersão dos biomarcadores, previamente capturados em um mesmo microtubo de 2,0 mL pelo seu respectivo bioconjugado ($\text{Ab}_2\text{-PM-HRP}$), foi injetada no canal microfluídico seguido pela detecção amperométrica conforme descrito na seções 3.2.3. As respostas transientes de densidade de corrente e as curvas de calibração são apresentadas na figura 3.7. Na figura é possível observar o incremento da densidade de corrente frente a diferentes concentrações dos biomarcadores p16 e Tp53.

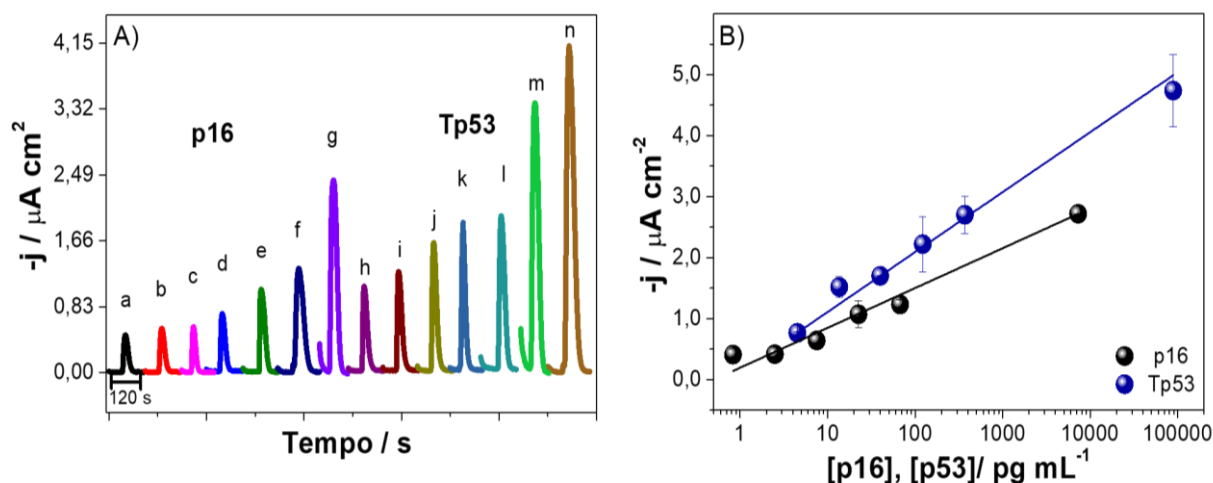


FIGURA 3.7 – A) Respostas amperométricas para soluções padrões de p16 (a- branco; b-g: 0,83 a 7300 pg mL^{-1}) e p53 (h- branco; i-n: 4,5 a 89 000 pg mL^{-1}). B) Curva analítica para p16 (preta) e Tp53 (azul). Os parâmetros utilizados foram tempos de 20 minutos para a magneto-imuno captura dos biomarcadores e 30 minutos para a formação do imunossensor do tipo sanduíche, solução de detecção contendo 0,1 mmol L^{-1} de HQ e 1,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 , e taxa de vazão de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$.

A figura 3.7 A apresenta as respostas obtidas com a injeção de HQ e H_2O_2 no sistema microfluídico. Como se pode notar, as respostas para o branco (a e h) também apresentaram respostas de densidade de corrente, evidenciando também a adsorção das PMs sobre a superfície dos 8-ET à base de ouro. Este é um efeito recorrente observado para as PMs é minimizado utilizando com o uso de 0,1% (m/v) da solução de BSA (m/v) e PBS-T20 nas soluções contendo o bioconjugado ⁷⁶. A eficiência da construção do imunossenso proposto foi confirmada pelo incremento das correntes de pico com o aumento das concentrações de cada biomarcador. Ao se analisar a figura 3.7 B observa-se a linearidade entre o sinal de densidade de carga com e o logaritmo das concentrações dos biomarcadores. A faixa linear para o p16 foi entre 0,83 a 7.300 pg mL^{-1} ($r = 0,996$), enquanto que para o TP53 foi de 4,5 a 89.000 pg mL^{-1} ($r = 0,998$). Este imunossensor apresentou alta sensibilidade cerca de 0,653 $\mu\text{A cm}^{-2} \log [\text{p16}]$ e de 0,983 $\mu\text{A cm}^{-2} \log [\text{Tp53}]$. Os limites de detecção foram calculados utilizando a equação 2.4, três vezes o desvio padrão de dez branco dividido pela sensibilidade (coeficiente angular da reta), e se apresentaram ultrabaixos com valores de 0,08 pg mL^{-1} para p16 e 0,4 pg mL^{-1} para Tp53. Os baixos desvios padrão evidenciam uma excelente precisão entre os eletrodos presente no arranjo eletrodo de ouro. Vale ressaltar que a faixa de concentração obtida com ambos os

biomarcadores é clinicamente relevante, visto que ambos os biomarcadores tem sua expressão aumentada na maioria dos casos em indivíduos saudáveis, enquanto que para pacientes com câncer a expressão tende a diminuir devido à irregularidade do ciclo celular. Na tabela 3.1 são apresentados trabalhos reportados na literatura e comparados com o imunoenensaio proposto. Poucos trabalhos na literatura reportam a quantificação da proteína p16 relacionada à pacientes com câncer, a maioria deles estão relacionados a metilação do gene ou a análise qualitativa da presença ou ausência destas proteínas por imuno-histoquímica em análises de biópsias, por exemplo ^{37,137,138}.

TABELA 3.1 – Comparação do resultado obtido para a detecção do biomarcador p16 com trabalhos reportados na literatura.

Plataforma	Técnica	Faixa linear (pg mL ⁻¹)	LD (pg mL ⁻¹)	Ref.
Cristal PZ/SPA	QCM	5,0×10 ⁴ – 1,2×10 ⁶	10×10 ³	139
SPE/CNT	LSV	1,56×10 ⁴ - 2,5×10 ⁵	4,9×10 ²	140
SPE/PDDA/AuNPs	AMP	8,3×10 ⁻¹ - 7,3×10 ³	8×10 ⁻²	Este trabalho

PZ – pizeoelétrico; SPA - *Staphylococcal protein A* (Proteína estafilocócica A) CNT – *carbon nanotubes* (nanotubos de carbono); QCM - *quartz crystal microbalance* (microbalança de quartzo); LSV – *linear scan voltammetry* (voltametria de varredura linear).

O primeiro trabalho abordado por Yang e colaboradores é um imunossensor piezelétrico, no qual o cristal de quartzo foi modificado proteína estafilocócica A e Ab₂ anti-p16 para a detecção de p16INK4a e aplicados em amostras de esfregaços provenientes do exame citopatológico Papanicolau. Apesar da sua ampla faixa de detecção ng a µg mL⁻¹, este método quando comparado ao imunoenensaio proposto por este trabalho é mais invasivo, uma vez que há necessidade da coleta do material via exame preventivo, em contrapartida ao uso de µL de soro de pacientes com câncer pelo método proposto ¹³⁹.

Duangkaew e colaboradores desenvolveram um imunossensor voltamétrico do tipo sanduíche para detecção de p16. Para ancoramento das moléculas biológicas e amplificação do sinal analítico, modificou-se a superfície dos eletrodos impressos de carbono com CNT e se utilizou nanopartículas de prata e ouro para amplificação do sinal analítico. O imunossensor foi aplicado em lisados de células Hela e esfregaços cervicais ¹⁴⁰.

Ao comparar os resultados obtidos neste projeto com o da literatura apresentado na tabela 3.1, o imunoensaio proposto apresenta-se cerca de pelo menos 10.000 vezes menores, além de permitir a detecção simultânea de dois biomarcadores em um menor tempo de análise sem a necessidade de funcionalização de materiais carbonáceos como sugerido no trabalho publicado. O método proposto foi aplicado com sucesso para a detecção multiplexada de p16 e Tp53 devido à modificação dos 8-ETs/SAM com grupos terminais carboxilados, conseqüentemente viáveis para a imobilização covalente dos Ab₁ e, o uso PMs decoradas com Ab₂ e HRP para a captura dos biomarcadores contribuindo também para um efeito sinérgico, possibilitando uma faixa linear ampla de resposta de cerca de três décadas, compreendendo concentrações entre pg mL⁻¹ a ng mL⁻¹.

O tempo de ensaio para este tipo de imunossensor contabilizando a etapa de captura dos biomarcadores, etapa de formação do imunossensor e detecção eletroquímica foi em torno de 52 minutos. Este tempo de análise está bem abaixo ao método de ELISA (> 5 horas), além de que o imunoensaio possibilita também a análise de até 8 biomarcadores simultaneamente.

3.3.3 - Aplicação do imunoensaio multiplexado para p16 e Tp53 em amostras de pacientes com CC e CE

A aplicabilidade e exatidão do método foram confirmadas pela quantificação de ambos os biomarcadores em três amostras de pacientes com CC e CE, tanto para o método proposto quanto para o método ELISA. A figura 3.8 ilustra os valores obtidos com ambos os métodos.

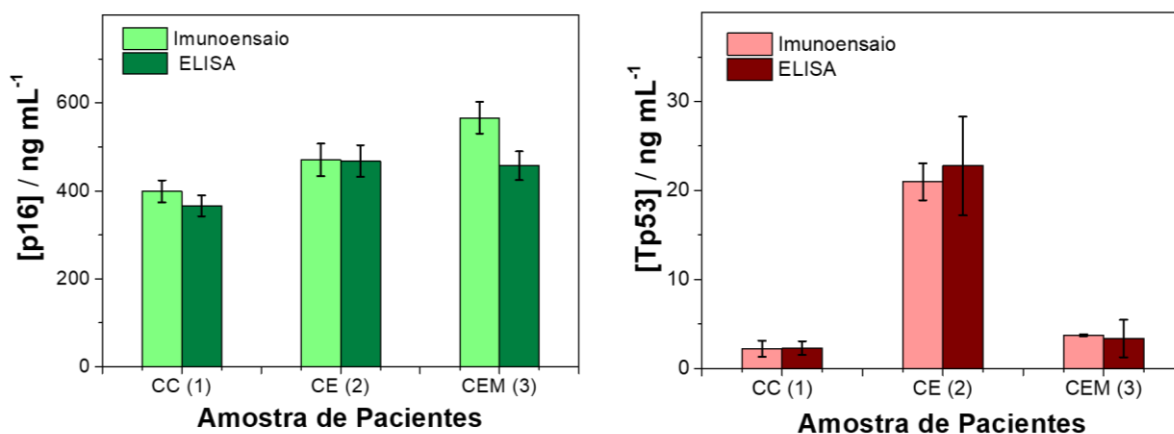


FIGURA 3.8 – Imunoensaio eletroquímico e ELISA. Resultados para as proteínas p16 e Tp53 para pacientes com câncer (CE- câncer endometrial; CEM: câncer endometrial com metástase e CC- câncer cervical).

Uma excelente correlação entre as duas técnicas foi encontrada. As concentrações de p16 variaram entre 400 e 470 ng mL⁻¹ para amostras de CC e CE sem estágio metastático, enquanto que para o paciente com CE em metástase o mesmo apresentou-se em 566 ng mL⁻¹, aproximadamente. Apesar de não apresentarem diferença significativa nos valores de concentrações, o p16 apresentou-se um pouco maior em estágio metastático, o que pode evidenciar uma possível expressão desta proteína com os estágios mais avançados do câncer. Este comportamento foi evidenciado em trabalhos previamente reportados na literatura ^{37,137,138}, tornando este biomarcador viável na aplicação de um painel de biomarcadores, principalmente em conjunto com o biomarcador Tp53, visto que este é o biomarcador diretamente relacionado ao ciclo celular. O biomarcador p16 tem também ligação com o ciclo celular, e tem sua expressão aumentada de forma a controlar a ativação irregular do ciclo celular ¹⁴¹, muitos estudos relatam a expressão aumentada com o surgimento da malignidade nas células, sendo assim é um potencial biomarcador para diagnóstico precoce, avaliação terapêutica e alguns trabalhos relatam como promissora ferramenta para prognóstico. O Tp53 variou entre 2,3 a 21 ng mL⁻¹ para os pacientes com CC e CE, não havendo nenhuma diferença significativa para pacientes com o sem metástase neste estudo.

O teste t de *student* pareado foi aplicado para confirmar a exatidão do método com nível de confiança de 95%, ou seja, confirmar que não apresentaram diferença estatística significativa entre os valores de concentrações encontrados tanto pelo ELISA quanto pelo imunoensaio proposto. Para o p16 o t calculado (1,52) foi cerca de

três vezes menor que o t crítico (4,30), enquanto que para o Tp53 foi cerca de cinco vezes menor (t calculado 0,76), evidenciando assim a viabilidade do método proposto em detectar esses biomarcadores simultaneamente sem reações intercruzadas entre eles.

3.4 CONCLUSÕES

O método proposto combina a versatilidade do uso da técnica de impressão à jato de tinta com a técnica de serigrafia, para a fabricação de dispositivos cuja matriz de eletrodos de trabalho é a base de ouro com área geométrica de $0,3 \text{ mm}^2$, propiciando a construção de célula microfluídica totalmente descartável com a junção dessas matriz a um cartão adesivo dupla face, e com um volume total do canal microfluídico de $50 \mu\text{L}$ de reagentes e amostras. O baixo custo deste método pode estar relacionado aos pequenos volumes de reagentes requeridos e ao uso de materiais simples, tendo um custo aproximado de R\$ 0,40 por dispositivo em material para a fabricação do dispositivo.

Pode-se citar vantagens inerentes ao método proposto pelo uso de célula eletroquímica com eletrodos de ouro modificados com monocamadas auto-organizadas, associadas ao uso de PMs massivamente decoradas com Ab_2 e HRP em conjunto com a detecção amperométrica, proporcionando análises rápida, em uma faixa linear ampla para ambos os biomarcadores entre pg mL^{-1} a ng mL^{-1} , com baixos limites de detecção sendo de $0,08 \text{ pg mL}^{-1}$ para o p16 e $0,04 \text{ pg mL}^{-1}$ para o Tp53. A aplicabilidade e exatidão do método na determinação simultânea dos biomarcadores p16 e Tp53 foi confirmada pela quantificação destas proteínas em amostras reais de pacientes com CC e CE pelo método ELISA e a boa correlação quando se compara os resultados obtidos com o imunoenensaio proposto.

Tanto o p16 quanto o Tp53 tem potencial de aplicabilidade para um painel de biomarcadores para CC e CE voltados para o diagnóstico destas doenças, uma vez que ambos os biomarcadores estão relacionados diretamente ao controle do ciclo celular. Sendo assim a simplicidade do método proposto pode ser uma ferramenta promissora em análises clínicas associando estes dois biomarcadores com até outros seis, viabilizando uma triagem mais efetiva destes cânceres como também um direcionamento mais adequado para o tratamento, auxiliando não apenas no diagnóstico precoce da doença, como também na avaliação terapêutica e recidiva da doença.

CAPÍTULO - 4

Magneto-imunoensaios eletroquímicos
com a utilização de nanopartículas
magnéticas (NPMs) revestidas com
lipídeos e poli-L-lisina para detecção da
oncoproteína E6

O terceiro método proposto combinou a simplicidade da técnica de serigrafia para a construção dos eletrodos impressos com o uso de imunossaios livres de enzimas utilizando AuNPs como marcadores eletroquímicos para a determinação de E6 em amostras de pacientes com CC e CE. Uma característica vantajosa desta método recai na realização das etapas de imuno-captura, separação e formação de estrutura tipo sanduíche sobre as nanopartículas magnéticas recobertas com lipídeos (LNPMs) sem a necessidade da modificação da superfície dos eletrodos de trabalho. O uso de LNPMs é de suma importância para imobilização de anticorpos monoclonais em sua superfície e, conseqüentemente garantir uma efetiva interação com a proteína associada ao papilomavírus humano E6 em amostras de soro de pacientes com câncer. Na figura 4.1, uma representação esquemática do imunossai eletroquímico que será abordado neste capítulo.

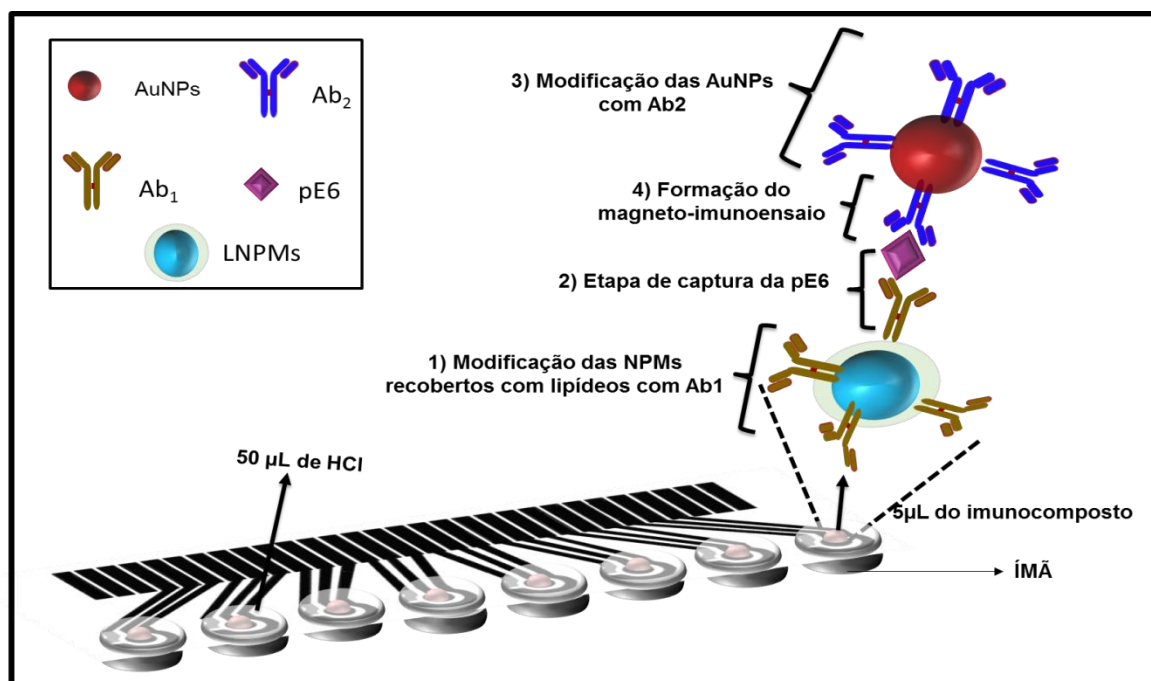


FIGURA 4.1 – Representação esquemática do magneto-imunossai proposto.

As etapas tanto de fabricação das células eletroquímicas, quanto as etapas de síntese, modificações das AuNPs e das LNPMs, formação do magneto-imunossai e detecção eletroquímica são abordados detalhadamente nos itens a seguir.

4.1 - MATERIAIS UTILIZADOS E EQUIPAMENTOS

O reagente 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxi (polietilenoglicol) -2000 foi adquirido da Polar Lipids, Inc. Os reagentes de cloreto de ferro (II) tetra-hidratado e cloreto de ferro (III) hexahidrato foram adquiridos da Sigma Aldrich. Os anticorpos policlonal e monoclonal (anti-E6), a proteína E6 foram adquiridos da LifeSpan BioSciences (Washington, EUA). Os reagentes fosfatidilcolina de ovo e colesterol foram adquiridos da empresa LIPOID 80® (Gerbrás Química Farmacêutica LTDA (São Paulo, Brasil). O ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram adquiridos da Synth (Diadema, São Paulo). Os demais reagentes e equipamentos já foram listados nos capítulos anteriores.

4.2 - PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 - Fabricação dos eletrodos

A fabricação de um arranjo contendo 8 células eletroquímicas individuais foi realizada pela técnica de serigrafia conforme mencionado nos capítulos anteriores. A figura 4.2 ilustra as etapas na confecção das mesmas.

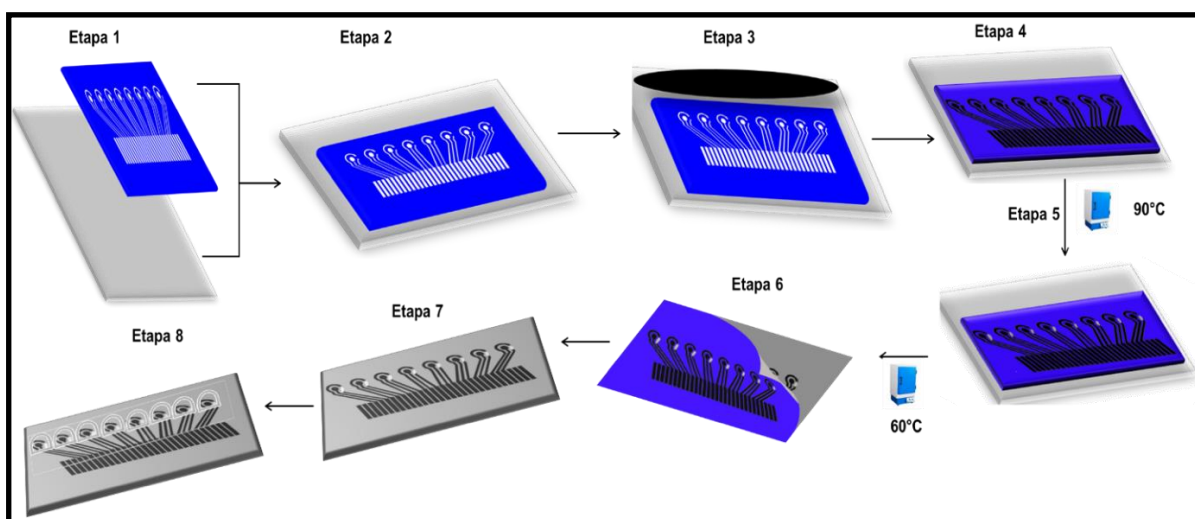


FIGURA 4.2 – Representação esquemática da construção das células eletroquímicas: etapa 1 e 2 – fixação da máscara negativa de adesivo vinílico, com os desenhos das células, sobre uma folha de poliéster. Etapa 3 e 4 - serigrafia e cura da tinta de carbono por 30 minutos a 90 °C. Etapa 5 e 6 – aplicação da tinta de Ag|AgCl cura por 30 minutos a 60 °C. Etapa 7 – Eletrodos prontos com a retirada do adesivo vinílico e Etapa 8 – Delimitação da área dos eletrodos e contato elétrico com uma máscara de poliseal prensada a quente.

4.2.2 - Síntese das nanopartículas magnéticas

Nanopartículas de magnetita (NPMs de Fe_3O_4) foram preparadas pelo método de coprecipitação^{142,143}. As etapas para a síntese são descritas por:

- **Etapa 1** – dissolveram-se 1,55 g de cloreto de ferro (II) tetra-hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 3,05 g de cloreto de ferro (III) hexahidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em 62,5 mL de água e 2,5 mL de HCl. A proporção de Fe(II)/Fe(III) foi de 1:2, respectivamente. A solução foi agitada e aquecida a 60°C durante 30 minutos. Em conjunto, em um outro béquer adicionou-se 18,75 g de NaOH em 312,5 mL de água mantida sob agitação e aquecida a 60 °C durante 30 minutos.

- **Etapa 2** – A solução alcalina foi transferida rapidamente para a mistura Fe(II)/Fe(III) e mantida por mais 30 minutos sob agitação à 60 °C.

- **Etapa 3** – Esta solução foi arrefecida até à temperatura ambiente e lavada com água por decantação magnética com o auxílio de um ímã de neodímio até a solução atingir a neutralidade¹⁴³.

- **Etapa 4** – As NPMs obtidas foram modificadas com citrato de sódio. Primeiro, uma dispersão de NPMs foi aquecida a 85 °C sob agitação por 30 minutos. Após, adicionou-se 0,19 mol L⁻¹ de citrato de sódio à dispersão sob agitação constante a 85 °C durante 30 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, as nanopartículas foram lavadas várias vezes com água até pH 7.

- **Etapa 5** – as NPMs foram ressuspendidas em 250 mL em água e armazenadas a 4 °C¹⁴³. A figura 4.3 ilustra as etapas envolvidas na síntese das NPMs.

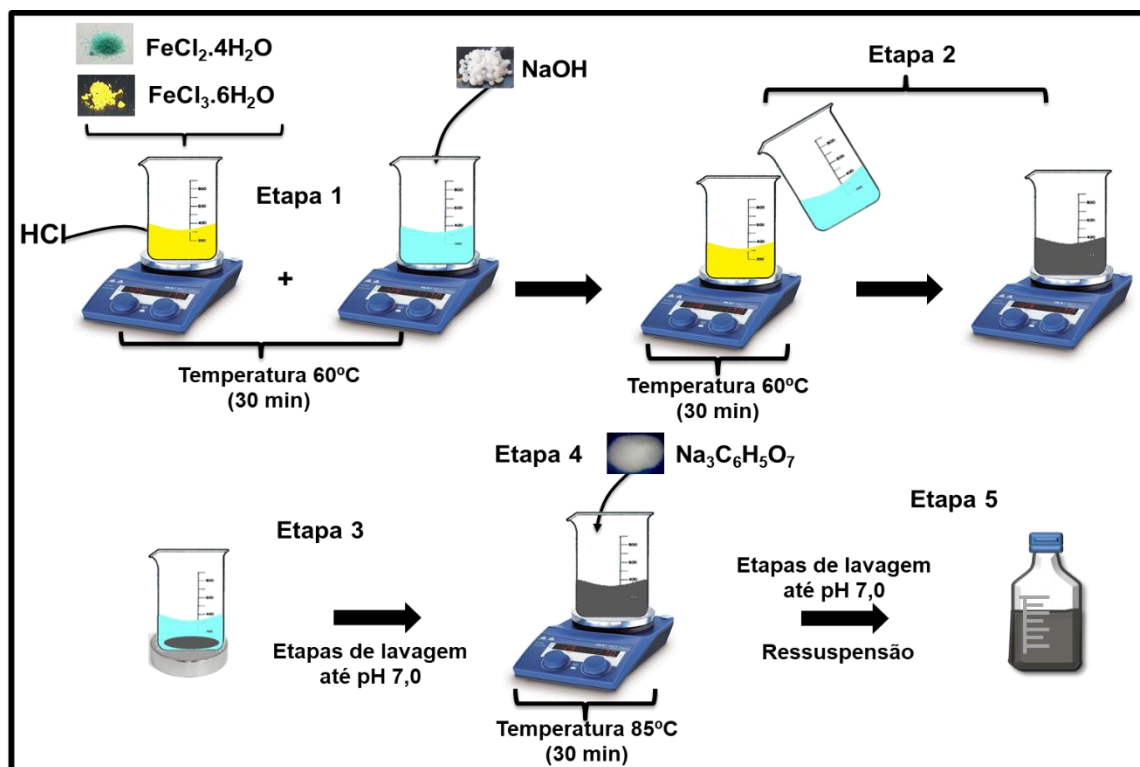


FIGURA 4.3 – Representação esquemática da síntese e modificação das NPMs pelo método de co-precipitação.

4.2.3 - Recobrimento das NPMs com lipídeos

- As etapas de recobrimento das NPMs com lipídeos foram realizadas adaptando o procedimento descrito por Sriraman e colaboradores, com também Martínez-González^{95,144}. A figura 4.4 ilustra as etapas envolvidas no recobrimento e formação das LNPMs.

- Etapa 1** – Uma mistura de 2,18 mL de fosfatidilcolina de ovo (EPC, solução estoque 25 mg mL^{-1}) e 0,495 mL de colesterol (solução estoque 25 mg mL^{-1}) preparada em clorofórmio foi adicionada a um balão de fundo redondo para formação do filme lipídico. O solvente foi evaporado em uma capela sob fluxo de nitrogênio. Em seguida, o balão foi colocado em estufa acoplada a uma bomba de vácuo com pressão de 10 mmHg por 4 horas à temperatura ambiente para a secagem no produto formado.

- Etapa 2** – Em seguida, a etapa de hidratação foi realizada com a adição de 2,0 mL da dispersão de nanopartículas magnéticas de forma a obter uma concentração lipídica de 10 mg mL^{-1} . Esta mistura foi mantida a 40°C por 20 minutos e submetida a vórtex a cada 5 minutos por 30 segundos.

- **Etapa 3** – A mistura foi transferida para um tubo falcon de 50 mL. Dessa forma, a mistura foi tratada com um ultrassom de ponta por 10 ciclos de 30 segundos com 1 minuto de intervalo entre cada ciclo. Esta etapa foi importante para garantir que um maior número de NPMs fossem encapsuladas pelo lipídio formado.
- **Etapa 4** – Separadamente, em um frasco de vidro âmbar com tampa foram adicionados 68,8 μL de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxi (polietilenoglicol) -2000 (ácido carboxílico PEG2000-DSPE) em clorofórmio e, o solvente foi evaporado em atmosfera de nitrogênio.
- **Etapa 5** – Em seguida, as NPMs de lípido (LNPMs) foram transferidas para frasco de vidro âmbar e incubadas a 37 °C por 18 horas para permitir a incorporação completa das cadeias de PEG na membrana lipídica.

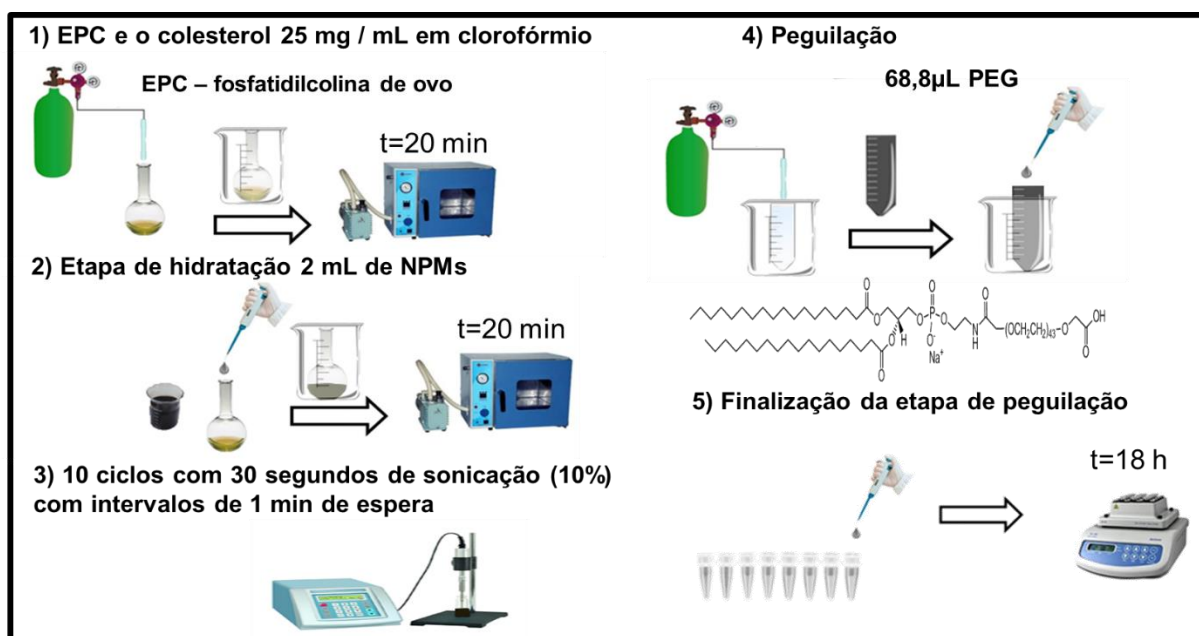


FIGURA 4.4 – Representação esquemática do recobrimento das NPMs com lipídeos (LNPMs), as etapas 1 e 2 são realizadas à 40 °C, 10 mmHg por 20 minutos; etapa 5 realizada em 400 rpm a 37 °C.

4.2.4 - Modificação das LNPMs com anticorpos monoclonais ($\text{Ab}_{1\text{E}6}$) e captura do biomarcador E6

Resumidamente, 100 μL da dispersão de LNPMs 10 mg mL^{-1} foi adicionado a um microtubo de 1,5 mL e o sobrenadante foi descartado usando uma estante magnética. As LNPMs foram lavadas três vezes com tampão MES (pH 5,2). Adicionou-se 200 μL de uma solução de poli-L-lisina a 0,005% diluída em tampão MES

(pH 5,2) durante 4 horas sob agitação lenta e constante, para assegurar o recobrimento das LNPMs com grupos aminos devido à interação eletrostática entre as nanopartículas magnéticas e a poli-L-lisina (PLL). Subsequentemente, o excesso de PLL foi descartado usando separação magnética, seguidas por três etapas de lavagens sucessivas com tampão MES. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e, 300 μ L de glutaraldeído a 2,5% (v/v) em água foram adicionados à solução de LNPMs e, a solução resultante foi mantida sob agitação lenta e constante por 30 minutos. Em seguida, 125 μ L de anticorpo monoclonal anti-E6 (Ab_1) foram adicionados à LNPMs/poli-L-lisina e colocados sob rotação lenta e constante por 24 horas à temperatura ambiente. Etapas de lavagem foram realizadas para eliminar o excesso de Ab_1 . Finalmente, a etapa de bloqueio foi realizada usando 1,0 mol L⁻¹ de glicina (pH 8,0). O bioconjugado formado (LNPMs/PLL/ Ab_1) foi lavado e ressuspensão com 200 μ L de PBS-T20, contendo 0,05% (v/v) de Tween-20 (PBS-T20) e 0,1% (m/v) de BSA. A figura 4.5 A apresenta as etapas envolvidas na modificação das LNPMs e, conseqüentemente formação dos bioconjugados.

A figura 4.5 B representa a etapa de magneto-captura da proteína E6 pelo bioconjugado LNPMs/PLL/ Ab_1 . Para a etapa de captura do biomarcador 10 μ L de LNPMs/PLL/ Ab_1 foi adicionado a um microtubo contendo 500 μ L das soluções padrão da proteína E6 ou soro de pacientes com câncer cervical e endometrial diluídas previamente em PBS pH 7,0. A solução foi mantida sob agitação lenta a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, o complexo LNP/PLL/ Ab_1 / pE6 foi separada da solução usando uma estante magnética para eliminar o excesso das proteínas E6 que não se ligaram. Três etapas de lavagem foram realizadas utilizando uma solução de 2,0% de BSA (m/v) diluída em PBS 7,0.

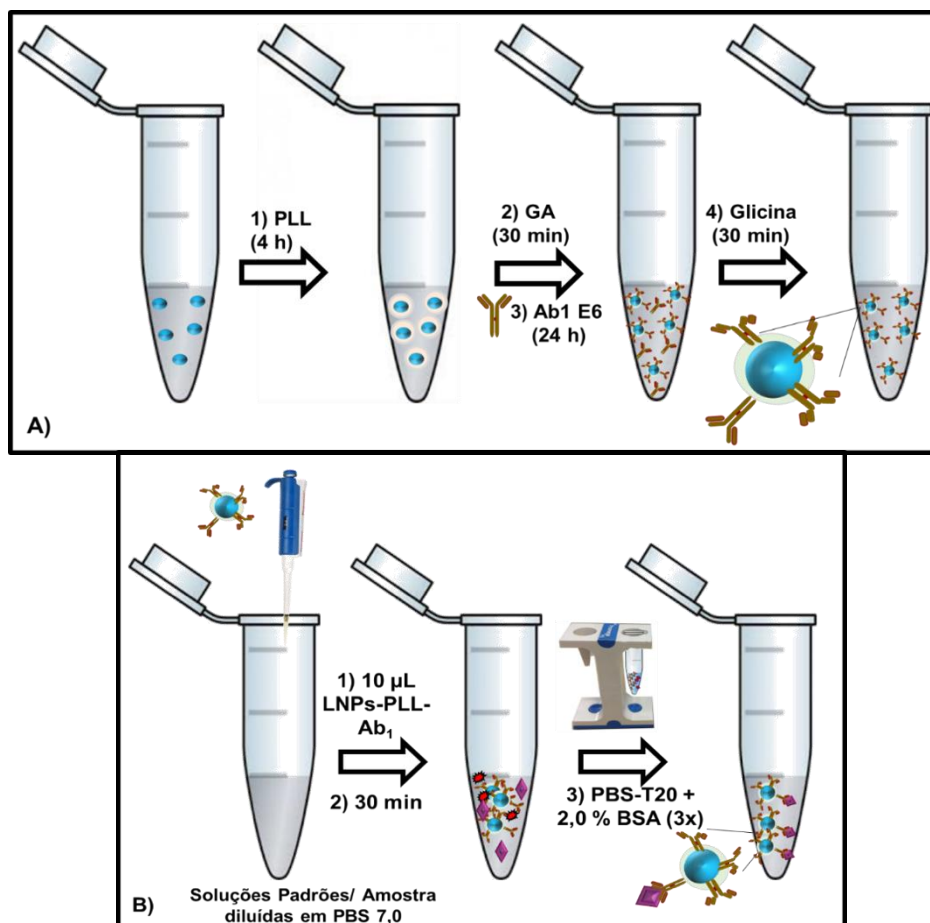


FIGURA 4.5 – Representação esquemática da A) formação do bioconjugado LNP/poli-L-lisina/Ab₁ e da B) captura do biomarcador E6 pelo bioconjugado.

4.2.5 - Síntese das nanopartículas de ouro funcionalizadas com citrato

As AuNPs modificadas com citrato foram sintetizadas pelo método de Turkevich com algumas modificações, sendo que o citrato de sódio foi usado tanto como agente redutor quanto estabilizante ¹⁴⁵. Para isto, dissolveram-se 48 mg de H_{AuCl}₄.xH₂O em 100 mL de água e, a solução foi mantida sob agitação constante (~850 rpm) e aquecida em um banho de água até atingir 85 °C. Em seguida, adicionou-se 10 mL de Na₃C₆H₅O a 71% (m/v). Após o tempo de 5 minutos de reação, a solução foi colocada em banho de gelo. Em seguida a solução foi transferida para um frasco de 500 mL e mantida a 4 °C.

4.2.6 Modificação das AuNPs com anticorpos policlonais

A modificação das AuNPs com Ab₂ foi realizada seguindo o procedimento de Oliveira e colaboradores com algumas modificações⁷⁰.

A figura 4.6 ilustra as etapas para a modificação das AuNPs com Ab₂. Inicialmente, ajustou-se o pH da dispersão das AuNPs em 9,0 usando 50 mmol L⁻¹ de tampão borato (etapa 1). Adicionou-se 100 µL do anticorpo policlonal anti-E6 (Ab₂) e a solução foi mantida sob agitação lenta e constante por 35 minutos (etapa 2). Centrifugou-se a solução à 4 °C e 14.000 rpm por 20 minutos (etapa 3). O sobrenadante foi descartado e se adicionou 300 µL de 2,0% (m/v) de BSA em PBS 7,0 para a etapa de bloqueio e, a dispersão foi mantida sobre agitação lenta e constante por 20 minutos (etapa 4). Novamente, a dispersão contendo as AuNPs/Ab₂ foi centrifugada à 4 °C e 14.000 rpm (etapa 5). O bioconjugado formado entre as AuNPs e Ab₂ foi ressuscitado em 1,5 mL de PBS 7,4 contendo 0,3% (m/v) de BSA (etapa 6).

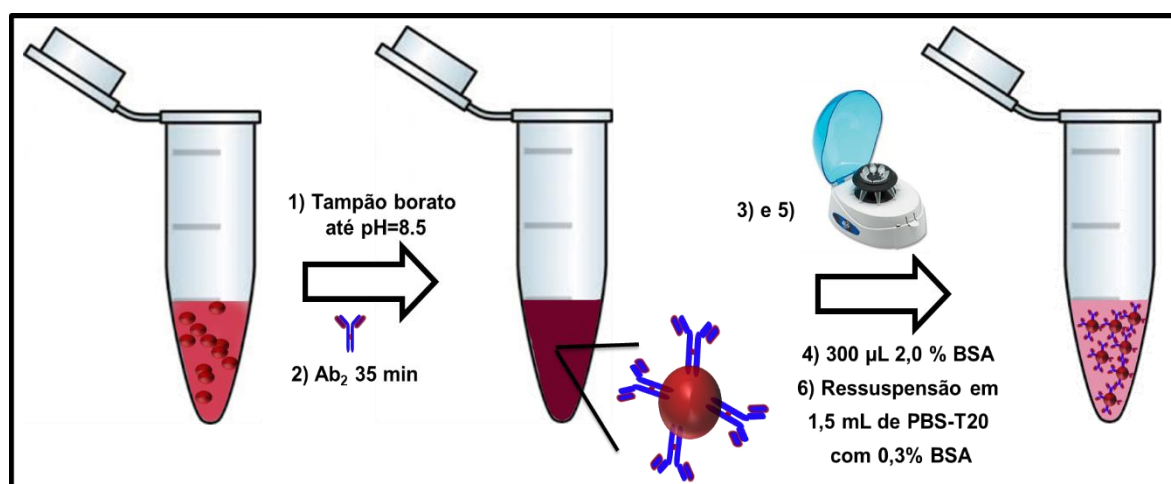


FIGURA 4.6 – Representação esquemática da formação do bioconjugado com AuNPs/ Ab₂.

4.2.7 - Imunoensaio sanduíche e etapa de detecção eletroquímica

Neste método a estrutura tipo sanduíche entre os anticorpos e o antígeno foi formada sobre a superfície das nanopartículas magnéticas, ao invés da superfície dos eletrodos como nos métodos anteriores.

Para a formação do imunoenensaio do tipo sanduíche, representada pela figura 4.7, 140 μL de $\text{Ab}_2\text{-AuNPs}$ foi adicionado as LNPMs após a etapa da captura do biomarcador E6 descrita anteriormente e incubados por cerca de 30 min, este tempo foi otimizado, formando o magneto-imunoconjugado do tipo sanduíche de LNPMs- PLL- $\text{Ab}_1/ \text{pE6} / \text{Ab}_2\text{-AuNPs}$. O imunoenensaio formado foi lavado duas vezes com PBS-T20 + 0,1% de BSA (m/v) com o auxílio de uma estante magnética. Em seguida, ressuspendeu-se o imunoenensaio em 100 μL de PBS-T20 (pH 7,0).

Para a etapa de detecção eletroquímica, figura 4.7 B, 5 μL do imunoenensaio formado foi adicionado a cada eletrodo de trabalho, vale ressaltar que na parte de trás de cada eletrodo de trabalho foi posicionado um ímã de neodímio, e após 1 minuto o sobrenadante foi descartado e, se adicionou 50 μL sobre cada eletrodo de uma solução de 0,2 mol L^{-1} de HCl. Um potencial fixo de +1,25 V foi aplicado por 120 s seguido por voltametria de onda quadrada, em uma janela de potencial de +1,25 a -0,15 V usando os seguintes parâmetros: 50 Hz de frequência, potencial de *step* 0,004 V e potencial de amplitude de 0,04 V.

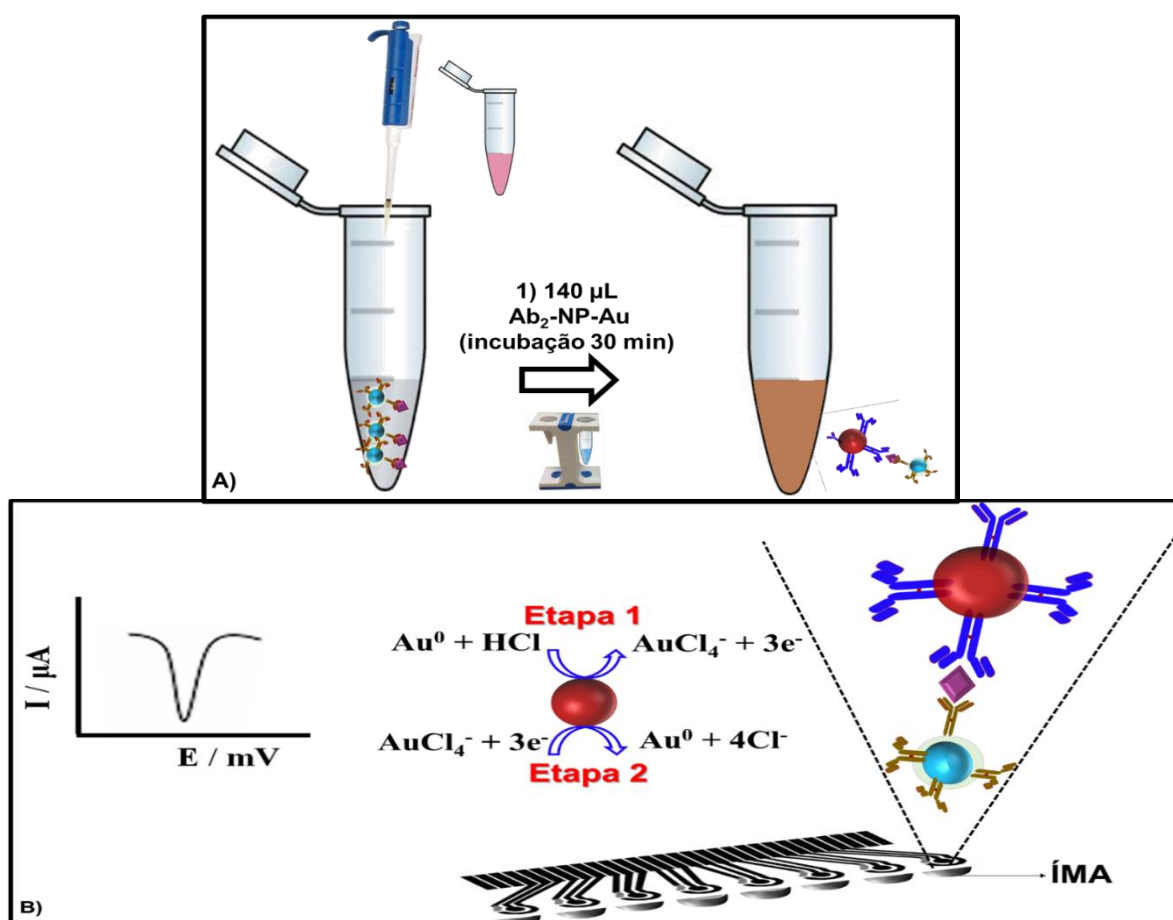


FIGURA 4.7 – Representação esquemática da A) formação do imunoenensaio LNPMs-poli-L-lisina- $\text{Ab}_1/ \text{pE6}/ \text{Ab}_2\text{-AuNPs}$ e B) mecanismo da etapa de detecção eletroquímica.

4.2.8 Método comparativo ELISA

Para o biomarcador E6 um kit de ELISA do tipo sanduíche foi adquirido da LifeSpan BioSciences (Washington, EUA) e o protocolo LS-F12892 do fornecedor foi seguido. Para isso, a placa de ELISA foi sensibilizada com 50 μL das soluções padrão dos biomarcadores e amostras diluídas por 2 horas à 37 °C. A diluição dessas soluções foi realizada com o tampão de diluição fornecido pelo kit. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com 200 μL do tampão de lavagem. Uma alíquota de 50 μL do reagente de detecção A foi adicionado, e incubado por 1 hora à 37 °C. Após etapas de lavagens, 50 μL da solução de detecção B foi adicionada aos poços da placa, e incubado por 1 hora a 37 °C. Após etapas de lavagem, 45 μL da solução de TMB foi adicionada e incubada de 15 minutos até o surgimento de coloração azul. Para finalizar, uma alíquota de 50 μL da solução para bloqueio da reação é adicionada. A leitura colorimétrica foi realizada a 450 nm pelo leitor de microplaca Labtec (LT4000).

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 - Caracterização morfológica

A fim de avaliar a eficiência na síntese das AuNPs, das NPMs, bem como também das modificações das NPMs com lipídeo, análises de imagem por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas. Análise química por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) foi realizada para avaliar a formação do imunoenensaio em estudo. Na figura 4.8 estão apresentados esses estudos de caracterização.

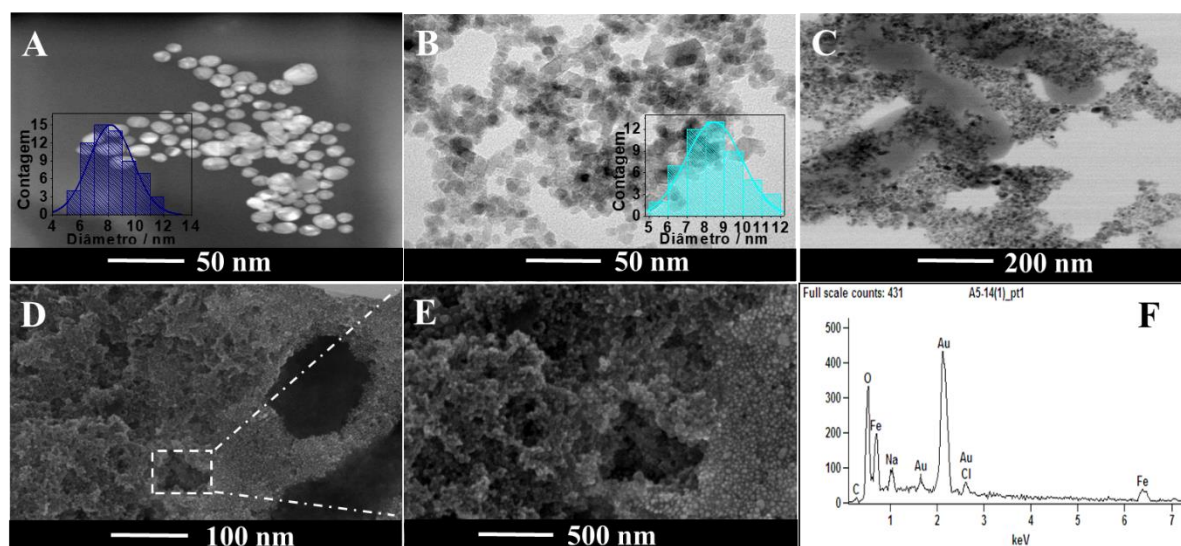


FIGURA 4.8 – Caracterização morfológica por microscopia de transmissão eletrônica (MET) em A) das AuNPs em Citrato e histograma (inserção), B) das NPMs e histograma (inserção) e C) das LNPMs e, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em D) e E) do imunoenensaio (LNPMs- poli-L-lisina- Ab₁/ pE6 / Ab₂-AuNPs.) e por EDX em F) do imunoenensaio.

A figura 4.8 A apresenta o caráter esférico e brilhante das AuNPs modificadas com citrato, sendo que o tamanho médio foi cerca de 8-9 nm, como pode ser observado no histograma, o que corrobora com trabalhos previamente reportados na literatura ¹⁴⁶. As NPMs também foram caracterizadas por MET (figura 4.8 B) e revelam a formação de aglomerados, na ordem de aproximadamente 9 nm como pode ser observado no histograma inserido, com caráter esférico, o que são intrínsecos destas partículas quando as mesmas são sintetizadas pelo método de co-precipitação ¹⁴². O recobrimento das NPMs com lipídeos pode ser evidenciado ao se observar a figura 4.8 C, com a presença de aglomerados das LNPMs encapsuladas por vesículas lipídicas ¹⁴⁷. Já a formação do imunoenensaio proposto foi avaliada por MEV e está apresentada nas figuras 4.8 D e E, apresentando duas regiões distintas, uma região mais opaca referente as LNPMs em contrapartida pelas regiões, cujas partículas tem caráter esférico mais definido em conjunto com seu aspecto brilhante, referente às AuNPs. A fim de corroborar as análises por imagens, análise química por EDX, figura 4.8 F, foi realizada e se obteve espectros com bandas de Fe e Au, portanto a presença das duas partículas e de Fe e Au evidenciam a formação do imunoenensaio.

4.3.2 - Caracterização eletroquímica

O comportamento eletroquímico das 8 células eletroquímicas foi avaliado pela técnica de voltametria cíclica usando $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido ferroceno monocarboxílico em KCl, com a variação da velocidade de varredura de 10 a 300 mV s^{-1} . A figura 4.9 apresenta as voltamogramas cíclicos obtidos e a variação do valor de corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura obtidas para as células eletroquímicas construídas.

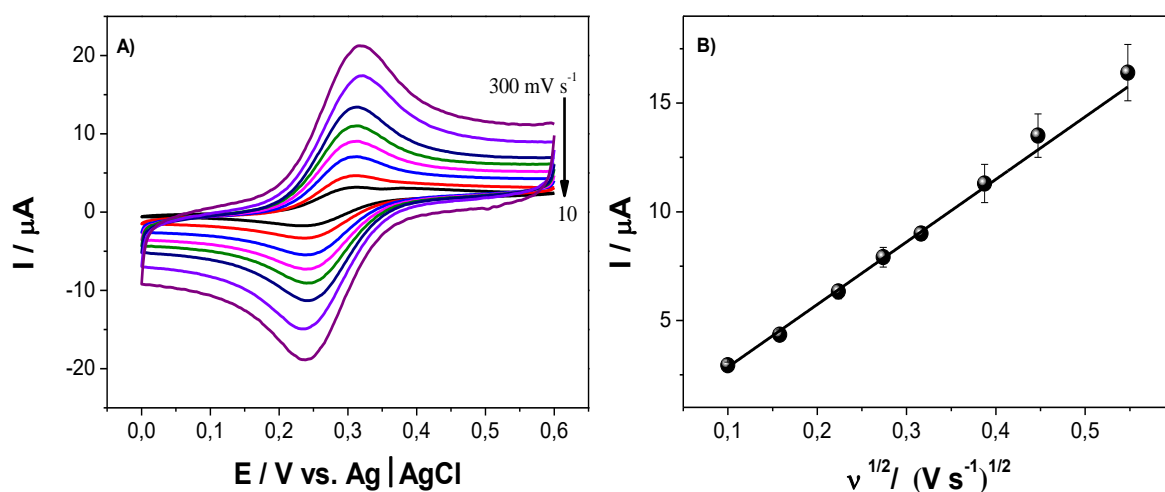
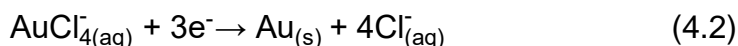
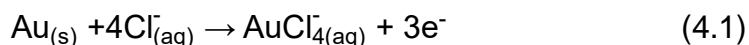


FIGURA 4.9 – Voltamogramas cíclicos em meio de ácido ferroceno monocarboxílico com concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de A) eletrodo de carbono sem modificação e B) Relação linear entre a corrente de pico anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura, variando-a de 10 a 300 mV s^{-1} .

Como pode ser observado na figura 4.9 A, os picos de oxidação e redução foram em $0,32 \text{ V}$ e $0,23 \text{ V}$ vs. pseudo $\text{Ag} | \text{AgCl}$, respectivamente. O processo eletroquímico quase-reversível também foi evidenciado, uma vez que a variação de potencial foi maior que 59 mV e, um acentuado deslocamento para regiões mais positivas com o aumento da velocidade de varredura. Este comportamento pode ser justificado pela composição heterogênea da tinta de carbono, bem como o uso de eletrodos de pseudo-referência. O perfil linear entre a intensidade de corrente anódica e raiz quadrada da velocidade de varredura pode ser observado na figura 4.9 B. A partir do coeficiente angular da curva e, utilizando a equação de Randles-Sevcik ¹¹³, a área eletroativa aparente, para 24 células eletroquímicas diferentes ($N_{\text{arranjos}} = 3$), foi de $7,18 \pm 0,72 \text{ mm}^2$, valor muito próximo ao da área geométrica de $7,07 \text{ mm}^2$.

4.3.3 - Diferentes modificações de NPMs para a formação do magneto- imunoensaio eletroquímico

A fim de assegurar melhor desempenho do imunoensaio proposto para a detecção da proteína E6, três diferentes estratégias foram avaliadas, sendo elas NPMs sem modificação, LNPMs e LNPMs-PLL na etapa de imobilização do Ab1, para posterior conjugação da pE6 e formação do imunoensaio do tipo sanduíche. Para isto, três diferentes concentrações de pE6 diluídas previamente em PBS 7,0 foram avaliadas para cada estratégia: 4,0, 20 e 100 fg mL⁻¹. A resposta analítica foi obtida por meio das AuNPs que atuaram como marcador eletroquímico neste trabalho. Inicialmente, em meio de HCl, as AuNPs são oxidadas na etapa de pré-condicionamento em um potencial fixo de +1,25 por 120s formando um complexo com os íons cloretos, AuCl₄⁻ (etapa 4.1), seguida da redução deste a Au_(s) pela técnica de voltametria de onda quadrada varrendo em uma janela de +1,25 a -0,15V (etapa 4.2). As equações envolvidas na etapa de detecção eletroquímica são representadas por:



Na figura 4.10 são apresentadas as respostas de corrente de pico catódico referente a redução do ouro em função da concentração de E6 obtidas com as diferentes NPMs estudadas.

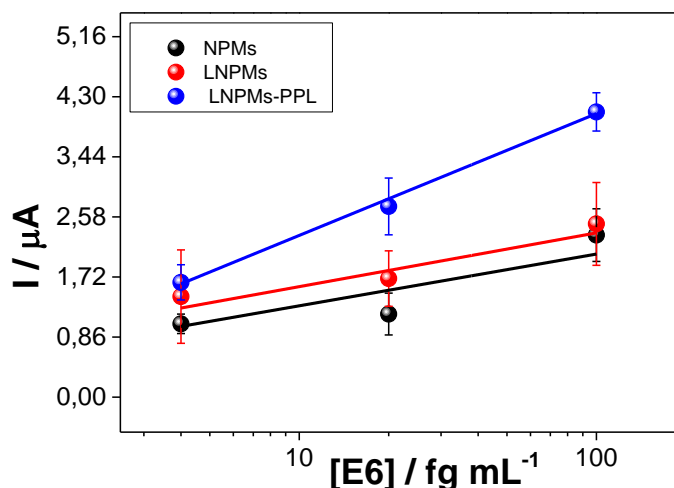


FIGURA 4.10 – Respostas de corrente de pico catódico para a redução das AuNPs frente a diferentes concentrações de E6 utilizando as NPMs sem modificação (esferas pretas), modificadas com lipídeos (esferas vermelhas) e modificadas com lipídeos e poli-L-lisina (esferas azuis) para a imobilização do Ab1 anti-E6. Concentrações de E6 na etapa de magneto-imuno captura de 4,0; 20,0 e 100 fg mL⁻¹. Tempo de condicionamento de 120 s a +1,25 V e varredura em janela de potencial de 1,25 a -0,15 V, usando os seguintes parâmetros: 50 Hz de frequência, potencial de *step* 0,004 V e potencial de amplitude de 0,04 V.

Como pode ser observado na figura 4.10, as NPMs sem modificação e LPMs apresentaram baixa sensibilidade quando comparado seus coeficientes angulares da reta com as LPMs-PLL. Isto pode ser justificado devido as vantagens inerentes ao uso de lipídeos e PLL, uma vez que maior número de grupamentos aminos estão disponíveis para a ligação covalente com o Ab₁ e, conseqüentemente maior número de ligação entre a E6 e Ab1¹⁴⁸. A presença do lipídeo e poli-L-lisina nas NPMs levaram a um aumento de cerca de 43% na sensibilidade do método proposto. Sendo assim, as etapas seguintes para o desenvolvimento do magneto imunoensaio foram realizadas com as LPMs-PLL.

4.3.4 - Otimização dos parâmetros experimentais para o imunoensaio

A fim de assegurar o melhor desempenho do imunoensaio eletroquímico, alguns parâmetros foram otimizados para a formação do magneto-imunoensaio tais como: concentração de Ab₁ utilizada na imobilização sobre as LNPMs/PLL,

concentração de Ab₂ para imobilização das AuNPs e o tempo de captura do analito pelas LNPMs/PLL. A figura 4.11 apresenta os valores de corrente catódica obtidos para cada parâmetro estudado utilizando o imunoenensaio proposto.

Para cada estudo duas diferentes concentrações do biomarcador E6 foi medida em conjunto com o branco. As soluções padrão foram previamente diluídas em PBS 7,0. É importante enfatizar que o branco apresentou sinal analítico, que pode ser justificado pela adsorção das AuNPs sobre a superfície das LNPMs. Na figura 4.11 A pode-se notar que a concentração de 10 µg mL⁻¹ para Ab₁ foi eficiente na detecção de E6 e houve uma diferença significativa entre o branco e as concentrações de 0,1 pg mL⁻¹ e 2,5 pg mL⁻¹. Para concentrações de 5,0 e 20 µg mL⁻¹, a concentração de Ab₁ não foi eficiente para detecção de concentrações mais elevadas, não se podendo diferenciar significativamente as distintas concentrações de E6. As demais concentrações de Ab₁ não apresentaram um incremento significativo de corrente como o de 10 µg mL⁻¹, sendo está concentração selecionada para os demais estudos. Para o Ab₂, figura 4.11 B, uma concentração de 3,5 µg mL⁻¹ foi suficiente para a detecção da pE6 nas diferentes concentrações estudadas e as diferenciar do sinal do branco. Para baixas concentrações, a quantidade de Ab₂ foi insuficiente para diferenciar e quantificar as concentrações em estudo, enquanto que para concentrações de 6,7 µg mL⁻¹, o excesso de reagentes pode ter ocasionado competição entre os Ab₂ e poucos foram capaz de se ligarem à superfície das AuNPs, não sendo eficiente essa concentração para a detecção e diferenciação destas duas concentrações do E6. O tempo de captura de 30 minutos para reconhecimento do E6 pelos Ab₁, representado pela figura 4.11 C, foi suficiente para a detecção deste biomarcador, não havendo a necessidade de tempos de ensaio muito longos, uma vez que estes podem ocasionar uma saturação do sinal analítico mais rápido, dificultando estudos subsequentes com uma faixa de concentração mais ampla.

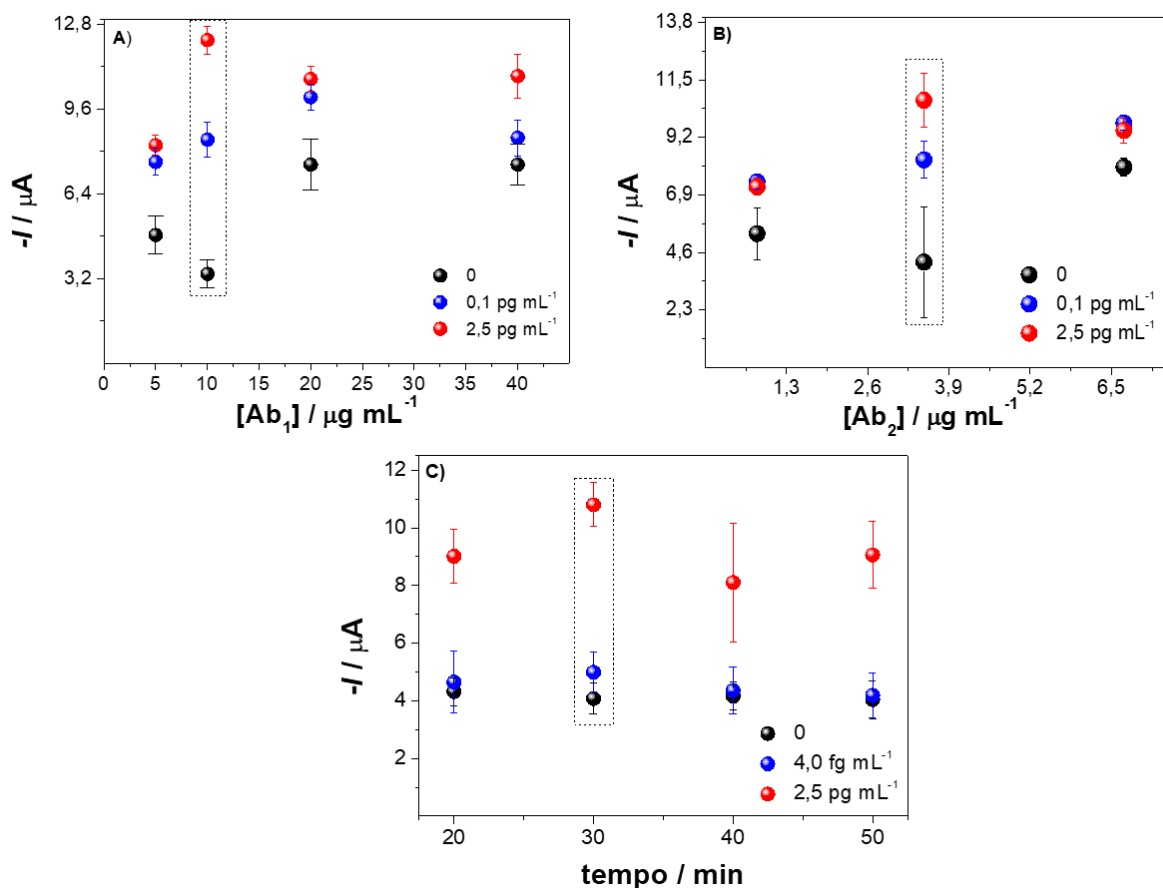


FIGURA 4.11 – Otimização da concentração de A) Ab₁ nas NPMs, de 5, 10, 20 e 40 µg mL⁻¹, sendo a concentração fixa de Ab₂ de 3,5 µg mL⁻¹ e 30 min para tempo de captura do analito e formação do imunoensaio; B) da concentração de Ab₂ nas AuNPs, de 0,83; 3,5 e 6,7 µg mL⁻¹, sendo a concentração de Ab₁ fixa em 10 µg mL⁻¹, 30 min tempo de captura e imunoensaio e; respectivamente; e C) do tempo de captura da proteínas E6 pelo Ab₁ presente nas NPMs, de 20, 30, 40 e 50 min, sendo concentração fixa de 10 µg mL⁻¹ de Ab₁, 3,5 µg mL⁻¹ de Ab₂ e 30 minutos de tempo para a formação do imunoensaio. Tempo de condicionamento de 120 s a +1,25 V e varredura em janela de potencial de 1,25 a -0,15 V usando os seguintes parâmetros: 50 Hz de frequência, potencial de *step* 0,004 V e potencial de amplitude de 0,04 V.

4.3.5 - Curva de calibração para o E6

Após a otimização de etapas envolvidas no desenvolvimento do magneto-imunoensaio para a determinação da pE6 usando como marcador eletroquímico o ouro, construiu-se a curva de calibração em soluções padrão deste biomarcador. Para este estudo, foram utilizadas na etapa de captura, as seguintes concentrações de E6:

0,0; 0,004; 0,02; 0,1; 0,5 e 2,5 pg mL^{-1} . A proteína E6 foi previamente diluída em PBS (pH 7,0). A figura 4.12 apresenta os perfis voltamétricos obtidos pela técnica de voltametria de onda quadrada para o imunoenensaio eletroquímico proposto em diferentes concentrações de E6 e a curva calibração para o método proposto.

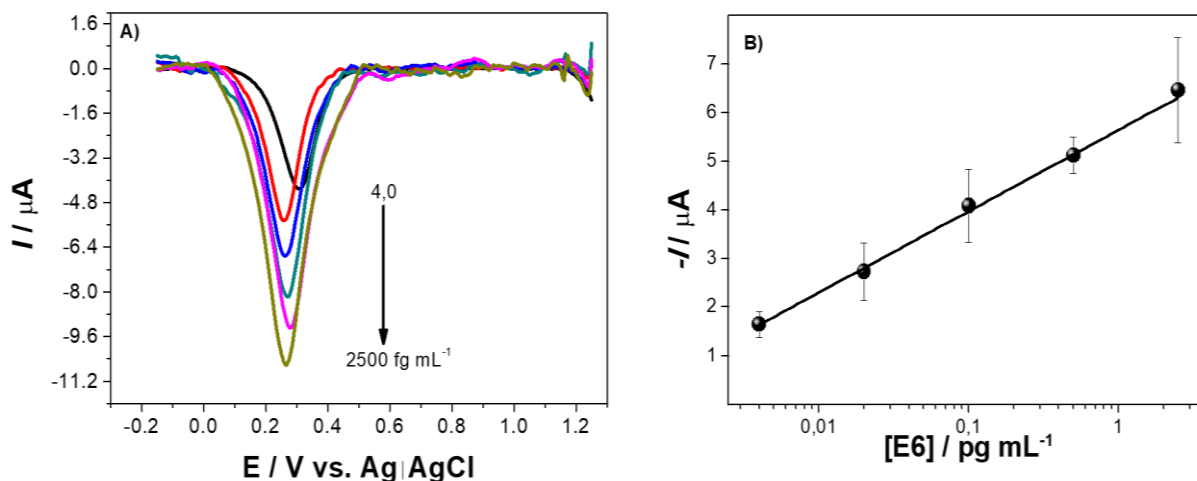


FIGURA 4.12 – A) Perfis voltamétricos para diferentes concentrações de E6 e B) Curva analítica para a proteína E6. Tempo de condicionamento de 120s a +1,25 V e varredura em janela de potencial de 1,25 a -0,15 V usando os seguintes parâmetros: 50 Hz de frequência, potencial de *step* 0,004 V e potencial de amplitude de 0,04V.

A figura 4.12 A demonstra o incremento da corrente de pico no potencial de redução do ouro em aproximadamente 0,26 V. A magnitude da resposta de corrente foi linear e proporcional ao logaritmo das concentrações de E6, figura 4.12 B, com o intervalo linear para as concentrações de E6 de 4,0 a 2500 fg mL^{-1} com a equação de regressão de $I (\mu\text{A}) = 25,7 + 1,67 \log [E6]$ e um coeficiente de correlação de 0,996. O limite de detecção foi calculado pela razão entre 3 vezes o desvio padrão de dez brancos pela sensibilidade, ou seja, o coeficiente angular da reta apresentada na figura 4.12 B e, sendo igual a 0,4 fg mL^{-1} .

O baixo limite de detecção e a alta sensibilidade obtidos pelo método usando o magneto-imunoconjugado de LNPMs-PLL-Ab₁/ pE6/ Ab₂-AuNPs pode estar relacionado as características advindas do uso de NPMs com lipídeos, possibilitando um aumento na quantidade de interação com espécies biológicas¹⁴⁹. A ampla área superficial das LNPMs-PLL propicia grande quantidade de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, auxiliando na amplificação do sinal analítico e também, na imobilização efetiva de Ab₁ por ligação covalente cruzada com o do glutaraldeído. Outro fato a se mencionar é que a propriedade magnética facilita a eliminação de interferentes,

permitindo a captura e separação do analito da matriz da amostra ^{70,76,93}. Vale ressaltar também, que no método proposto as células eletroquímicas foram utilizadas apenas na etapa de detecção eletroquímica, minimizando reações não específicas, sendo as reações de afinidade entre antígeno-anticorpo ocorrendo na superfície das NPMs dentro de microtubos.

O imunoensaio proposto apresentou um baixo limite de detecção, no entanto, uma comparação efetiva com trabalhos da literatura não foi possível, uma vez que a quantificação da proteína E6 não é explorada de forma quantitativa na literatura, sendo encontrados trabalhos para a detecção de DNA referente a E6. Civit e colaboradores propôs a utilização de genossensores eletroquímicos para determinação multiplexada de genes relacionados ao HPV ¹⁵⁰. O método utiliza como marcador a enzima HRP e como substrato TMB e, obteve-se limite de detecção de 100 pmol L⁻¹ em uma faixa linear de de 5 pmol L⁻¹ a 40 µmol L⁻¹.

Com relação a repetibilidade das medidas, para a concentração de 4,0 fg mL⁻¹, estudos foram realizados intra-arranjo e inter-arranjo (n = 3), sendo obtidos valores de DPR de 3,8% e 7,4%, respectivamente, mostrando-se boa repetibilidade do método proposto. Portanto, a excelente repetibilidade do método confirma não apenas a correta formação do magneto-imunoensaio usando AuNPs como marcadores eletroquímicos, como também todas as etapas envolvidas na construção do dispositivo como a técnica de serigrafia para a fabricação das células eletroquímicas, delimitação da área das mesmas com polaseal, bem como a modificação adequada tanto das LNPMs-LPP com Ab₁ e das AuNPs com Ab₂.

4.3.6 - Aplicação do magneto-imunoensaio em amostras de pacientes

A exatidão do método proposto foi avaliada comparando os resultados obtidos com o método de ELISA. Este estudo compreendeu a análise de 5 amostras de soro de pacientes com câncer cervical e endometrial, sob aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer de Barretos e da Universidade Federal de São Carlos e, os pacientes foram previamente diagnosticados com CC ou CE em estágios metastáticos ou não. As amostras foram previamente diluídas em PBS (pH 7,0), na proporção 1:1.000.000, usando quantidades de 1,0 µL seguida de sucessivas diluições para a detecção da oncoproteína E6. A figura 4.13 apresenta os valores de

concentrações obtidas tanto para com o método proposto quanto com o ELISA para as diferentes amostras.

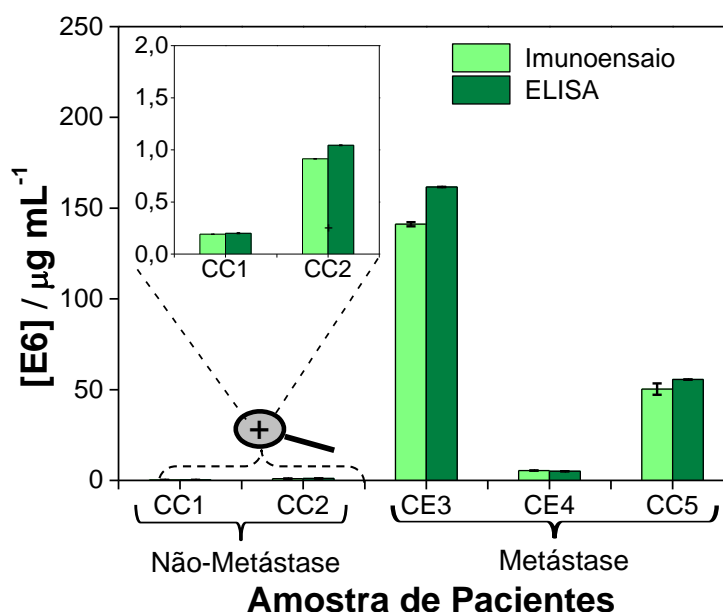


FIGURA 4.13 – Detecção de E6 em amostras de soro de pacientes com câncer utilizando o imunensaio desenvolvido e o ELISA (CE- câncer endometrial e CC- câncer cervical).

O teste *t-student* pareado foi realizado com o intuito de verificar a viabilidade do método proposto para a detecção deste biomarcador com o nível de confiança de 95%. O *t* calculado (1,28) apresentou-se menor que o *t* crítico (2,13), corroborando a concordância efetiva entre os métodos estudados, não havendo diferença estatística significativa entre as concentrações de pE6.

Apesar do número de pacientes avaliados serem pequeno, é interessante observar que as diferenças dos valores obtidos para os pacientes com e sem metástase foram bastante significativas, uma vez que o intervalo compreendido para câncer metastático foi entre 55,6 a 141 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que os demais pacientes estão na faixa de 0,2 a 1,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este comportamento apresentado pode estar relacionado ao papel da E6 na proliferação celular, inibindo morte celular e contribuindo assim, para o processo de colonização e metástase do câncer ¹⁵¹. Sendo assim a E6 torna-se atrativa para uso em painel de biomarcadores para estes tipos de cânceres em conjunto com outros biomarcadores. Além disso é imprescindível citar que o novo método proposto quando comparado ao ELISA é: rápido, uma vez que o protocolo utilizado para o método de comparação é cerca de

24 a 48 h de preparo; pode ser configurado de modo multiplexado utilizando diferentes nanopartículas de metais, enquanto que o ELISA é limitado a detecção de uma proteína por vez; baixo custo, uma vez que utiliza escala de μL para amostras, Ab_1 e Ab_2 , ao invés de aproximadamente 5,0 mL dos mesmos reagentes, também vale ressaltar o uso de materiais de baixa custo para a construção das células eletroquímicas.

4.4 - CONCLUSÕES

O método proposto mostrou-se uma ferramenta que pode vir a auxiliar no diagnóstico, prognóstico e avaliação terapêutica de câncer cervical e endometrial. Apesar do número de voluntários ser pequenos, uma diferença significativa entre pacientes com e sem metástase, tornando a aplicabilidade do biomarcador E6 atrativa em um painel de biomarcadores proteicos. O limite de detecção extremamente baixo alcançado pelo método proposto, possibilita a quantificação deste biomarcador proteico no soro o que pode auxiliar no diagnóstico precoce destas doenças. O imunoensaio eletroquímico proposto envolveu a construção de células eletroquímicas simples e totalmente descartáveis podendo ser de grande valia para análises clínicas, com vantagens quando comparados ao ELISA como o pequeno volume de amostras e reagentes, curtos tempos de análise e pode ser utilizado na detecção multiplexada de vários biomarcadores ao mesmo tempo.

CAPÍTULO - 5

CONCLUSÕES GERAIS E
PERSPECTIVAS FUTURAS

Os imunoenaios propostos são alternativas para a triagem, diagnóstico precoce, direcionamento de terapia e estadiamento das doenças em análises clínicas de cânceres uterinos, devido à sensibilidade, simplicidade e seletividade na detecção rápida dos biomarcadores (menos de 1 hora), propiciando ao paciente melhor acessibilidade ao rastreamento do câncer e, conseqüentemente melhoria da qualidade de vida, não se limitando ao uso de técnicas dispendiosas e morosas como ELISA e imunohistoquímica.

Os baixos limites de detecção foram alcançados, devido ao uso de nanopartículas de ouro, partículas magnéticas, monocamadas auto-organizadas e lipídeos, tornando os métodos propostos vantajosos, uma vez que o nível de cada biomarcador estudado tende a variar de acordo com o surgimento de células neoplásicas e estágio da doença.

Os dois primeiros métodos abordando imunoenamo amperométricos foram eficientes na detecção multiplexada de biomarcadores em pacientes com câncer cervical e endometrial, viabilizando uma detecção de até 8 biomarcadores em uma mesma análise e, conseqüentemente a construção de um painel de biomarcadores para um diagnóstico mais preciso dos cânceres cervicais e endometriais.

O terceiro método usando o magneto-imunoenamo é também uma ferramenta promissora para análises clínicas, pois pode ser facilmente fabricado e não requer atmosfera de N₂, além de poder ser configurado na detecção multiplexada de 8 proteínas para melhorar a precisão de diagnóstico com o uso de diferentes nanopartículas de metais.

Os trabalhos futuros vinculados a esta pesquisa serão:

✓ Imunossensor multiplexado incluindo as quatro proteínas: COX-2, p16, Tp53 e E6 em amostras de pacientes com câncer em uma maior gama de amostras, cujas serão incluídas amostras de indivíduos saudáveis.

✓ Acoplar o imunoenamo contendo LPMs a um sistema microfluídico e o utilizar em detecção simultânea dos biomarcadores Tp53 e E6, visto que são biomarcadores que apresentaram melhor relação com o grau de malignidade.

CAPÍTULO - 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. "Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer". Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>. (Acessado: 15 de abril de 2019)
2. "INCA solta estimativa de números de câncer no Brasil em 2018/2019 – CBDL – Câmara Brasileira de Diagnóstico Laboratorial". Disponível em: <https://cbdl.org.br/inca-solta-estimativa-de-numeros-de-cancer-no-brasil-em-2018-2019/>. (Acessado: 19 de abril de 2019)
3. PATEL, S.; LIYANAGE, S. H.; SAHDEV, A.; ROCKALL, A. G. & REZNEK, R. H. "Imaging of endometrial and cervical cancer". *Insights Imaging* **1**: 309, 2010.
4. "Cervical Cancer". Disponível em: <https://medlineplus.gov/cervicalcancer.html>. (Acessado: 20 de abril de 2019)
5. ZHANG, X.; ZHANG, L.; TIAN, C.; YANG, L. & WANG, Z. "Genetic variants and risk of cervical cancer: epidemiological evidence, meta-analysis and research review". *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **121**: 664, 2014.
6. ARYA, S. & ESTRELA, P. "Recent Advances in Enhancement Strategies for Electrochemical ELISA-Based Immunoassays for Cancer Biomarker Detection". *Sensors* **18**: 2010, 2018.
7. VU, M.; YU, J.; AWOLUDE, O. A. & CHUANG, L. "Cervical cancer worldwide". *Curr. Probl. Cancer* **42**: 457, 2018.
8. "Endometrial cancer statistics | World Cancer Research Fund". Disponível em: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/endometrial-cancer-statistics>. (Acessado: 20th April 2019)
9. CURRY, S. J.; KRIST, A. H.; OWENS, D. K.; BARRY, M. J.; CAUGHEY, A. B.; DAVIDSON, K. W.; DOUBENI, C. A.; EPLING, J. W.; KEMPER, A. R.; KUBIK, M.; LANDEFELD, C. S.; MANGIONE, C. M.; PHIPPS, M. G.; SILVERSTEIN, M.; SIMON, M. A.; TSENG, C.-W. & WONG, J. B. "Screening for cervical cancer". *JAMA* **320**: 674, 2018.
10. MITTELDORF, C. A. T. S. & MITTELDORF, C. A. T. S. "Cervical cancer screening: from Pap smear to future strategies". *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **52**: 238, 2016.
11. MAYRAND, M.-H.; DUARTE-FRANCO, E.; RODRIGUES, I.; WALTER, S. D.; HANLEY, J.; FERENCZY, A.; RATNAM, S.; COUtlÉE, F. & FRANCO, E. L. "Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer". *N. Engl. J. Med.* **357**: 1579, 2007.
12. NAUCLER, P.; RYD, W.; TÖRNBERG, S.; STRAND, A.; WADELL, G.; ELFGREN, K.; RÅDBERG, T.; STRANDER, B.; JOHANSSON, B.; FORSLUND, O.; HANSSON, B.-G.; RYLANDER, E. & DILLNER, J. "Human Papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer". *N. Engl. J. Med.* **357**: 1589, 2007.
13. CLARK, T. J.; VOIT, D.; GUPTA, J. K.; HYDE, C.; SONG, F. & KHAN, K. S. "Accuracy of hysteroscopy in the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasia". *JAMA* **288**: 1610, 2002.

14. AMANT, F.; MOERMAN, P.; NEVEN, P.; TIMMERMAN, D.; VAN LIMBERGEN, E. & VERGOTE, I. "Endometrial cancer". *Lancet* **366**: 491, 2005.
15. SONODA, Y. & BARAKAT, R. R. "Screening and the prevention of gynecologic cancer: Endometrial cancer". *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **20**: 363, 2006.
16. NIMSE, S. B.; SONAWANE, M. D.; SONG, K.-S. & KIM, T. "Biomarker detection technologies and future directions.". *Analyst* **141**: 740, 2016.
17. ISSAQ, H. J.; WAYBRIGHT, T. J. & VEENSTRA, T. D. "Cancer biomarker discovery: Opportunities and pitfalls in analytical methods". *Electrophoresis* **32**: 967, 2011.
18. STRIMBU, K. & TAVEL, J. A. "What are biomarkers?". *Curr. Opin. HIV AIDS* **5**: 463, 2010.
19. ALMEIDA, J. R. C. de; PEDROSA, N. de L.; LEITE, J. B.; FLEMING, T. R. do P.; CARVALHO, V. H. de & CARDOSO, A. de A. A. "Marcadores tumorais : revisão de literatura tumor markers : a literature review". *Rev. Bras. Cancerol.* 2007 **53**: 305, 2007.
20. TJALSMA, H.; SCHAEPS, R. M. J. & SWINKELS, D. W. "Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications". *Proteomics - Clin. Appl.* **2**: 67, 2008.
21. BAKHLE, Y. S. "Cox-2 and cancer: A new approach to an old problem". *Br. J. Pharmacol.* **134**: 1137, 2001.
22. HUANG, M.; CHEN, Q.; XIAO, J.; LIU, C. & ZHAO, X. "Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in cervical cancer: A meta-analysis". *Int. J. Cancer* **132**: 363, 2013.
23. KE, X.; DOU, F.; CHENG, Z.; DAI, H.; ZHANG, W.; QU, X.; DING, P. & ZUO, X. "High expression of cyclooxygenase-2 in uterine fibroids and its correlation with cell proliferation". *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **168**: 199, 2013.
24. CIMBALUK, D.; ROTMENSCH, J.; SCUDIÈRE, J.; GOWN, A. & BITTERMAN, P. "Uterine carcinosarcoma: immunohistochemical studies on tissue microarrays with focus on potential therapeutic targets". *Gynecol. Oncol.* **135**: 138, 2007.
25. YOUNG, J. L.; JAZAERI, A. A.; DARUS, C. J. & MODESITT, S. C. "Cyclooxygenase-2 in cervical neoplasia: A review". *Gynecol. Oncol.* **109**: 140, 2008.
26. FELIN, I. P. D.; GRIVICICH, I.; FELIN, C. R.; REGNER, A. & DA ROCHA, A. B. "Expressão de p53, p16 E COX-2 em carcinoma escamoso de esôfago e associação histopatológica". *Arq. Gastroenterol.* **45**: 308, 2008.
27. HOELLEN, F.; WALDMANN, A.; BANZ-JANSEN, C.; RODY, A.; HEIDE, M.; KÖSTER, F.; RIBBAT-IDEL, J.; THORNS, C.; GEBHARD, M.; OBERLÄNDER, M.; HABERMANN, J. K. & THILL, M. "Expression of cyclooxygenase-2 in cervical cancer is associated with lymphovascular invasion". *Oncol. Lett.* **12**: 2351, 2016.

28. TELLIEZ, A.; FURMAN, C.; POMMERY, N. & HENICHART, J.-P. "Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: topical therapeutic strategies targeting cox-2 expression and activity". *Anticancer. Agents Med. Chem.* **6**: 187, 2008.
29. YAMAGUCHI, K.; SUGANO, K.; FUKAYAMA, N.; NAKASHIMA, Y.; SAOTOME, K.; YOKOYAMA, T.; YOKOTA, T. & OHKURA, H. "Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms.". *Am. J. Gastroenterol.* 1997.
30. TOMMASINO, M.; ACCARDI, R.; CALDEIRA, S.; DONG, W.; MALANCHI, I.; SMET, A. & ZEHBE, I. "The role of TP53 in cervical carcinogenesis". *Human Mutation.* **21**(3):307-312, 2003.
31. BREMER, G. L.; G, T. A. T. M.; VAN DER PUTTEN, H. W. H. M.; DE HAAN, J. & ARENDS, J.-W. "p53 tumor suppressor gene protein expression in cervical cancer: relationship to prognosis". *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **63** (1): 55-59, 1995.
32. BROOKS, C. L. & GU, W. "Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: The molecular basis for p53 regulation". *Current Opinion in Cell Biology.* **15**(2):164-167, 2003.
33. MAXIMOV, G. K. & MAXIMOV, K. G. "The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis". *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **95**(4): 979-86, 2008.
34. SAHA, B.; ADHIKARY, A.; RAY, P.; SAHA, S.; CHAKRABORTY, S.; MOHANTY, S.; DAS, K.; MUKHERJEE, S.; MAZUMDAR, M.; LAHIRI, L.; HOSSAIN, D. M. S.; SA, G. & DAS, T. "Restoration of tumor suppressor p53 by differentially regulating pro-and anti-p53 networks in HPV-18-infected cervical cancer cells". *Oncogene* **31**(2):173-86, 2012.
35. RAYESS, H.; WANG, M. B. & SRIVATSAN, E. S. "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16". *Int. J. Cancer* **130**: 1715, 2012.
36. O'NEILL, C. J. & MCCLUGGAGE, W. G. "p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis". *Adv. Anat. Pathol.* **13**: 8, 2006.
37. YEMELYANOVA, A.; JI, H.; SHIH, I. M.; WANG, T. L.; WU, L. S. F. & RONNETT, B. M. "Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: Immunohistochemical analysis of 201 cases". *Am. J. Surg. Pathol.* **33**: 1504, 2009.
38. ENGELSEN, I. B.; STEFANSSON, I.; AKSLEN, L. A. & SALVESEN, H. B. "Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas". *Am. J. Obstet. Gynecol.* **195**: 979, 2006.
39. LLOBET, D.; PALLARES, J.; YERAMIAN, A.; SANTACANA, M.; ERITJA, N.; VELASCO, A.; DOLCET, X. & MATIAS-GUIU, X. "Molecular pathology of endometrial carcinoma: Practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints". *J. Clin. Pathol.* **62**: 777, 2009.

40. NOGUEIRA-RODRIGUES, A. & DE MELO, A. C. "*Perspectivas no Tratamento do Câncer do Colo do Útero: Explorando o Bloqueio da Sinalização Celular*". *Revista Brasileira de Cancerologia* 58, 2012.
41. MOODY, C. A. & LAIMINS, L. A. "Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation". *Nat. Rev. Cancer* 10: 550, 2010.
42. HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A. & GALLOWAY, D. A. "Papillomavirus E6 proteins". *Virology* 384: 324, 2009.
43. YIM, E.-K. & PARK, J.-S. "The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis". *Cancer Res. Treat.* 37: 319, 2005.
44. TONUTTIA, E.; BASSETTI, D.; PIAZZA, A.; VISENTINI, D.; POLETTI, M.; BASSETTO, F.; CACIAGLI, P.; VILLALTA, D.; TOZZOLI, R. & BIZZARO, N. "Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits.". *Autoimmunity* 37: 171, 2004.
45. MATOS, L. L. de; TRUFELLI, D. C.; DE MATOS, M. G. L. & DA SILVA PINHAL, M. A. "Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice.". *Biomark. Insights* 5: 9, 2010.
46. POWERS, A. D. & PALECEK, S. P. "Protein analytical assays for diagnosing, monitoring, and choosing treatment for cancer patients.". *J. Healthc. Eng.* 3: 503, 2012.
47. DURAIYAN, J.; GOVINDARAJAN, R.; KALIYAPPAN, K. & PALANISAMY, M. "Applications of immunohistochemistry". *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4: S307, 2012.
48. HAWES, D. et al., IN MODERN SURGICAL PATHOLOGY (SECOND EDITION), 2009. "Immunohistochemistry - an overview | ScienceDirect Topics". *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 2, 2015* 2015.
49. HOFMAN, F. "Immunohistochemistry". in *Current Protocols in Immunology* 49: 21.4.1, (John Wiley & Sons, Inc., 2002).
50. VASHIST, S. K. & LUONG, J. H. T. "Enzyme-Linked Immunoassays. in *Handbook of Immunoassay Technologies*" 97–127 (Academic Press, 2018).
51. "ELISA Illustrated Assay: Novus Biologicals". Disponível em: https://www.novusbio.com/support/support-by-application/elisa/illustrated-assay.html?utm_source=biocompare&utm_medium=referral&utm_campaign=futurelab&utm_content=ELISA Illustrated Assay. (Accessado: 20 de abril de 2019)
52. YIN, Y.; CAO, Y.; XU, Y. & LI, G. "Colorimetric immunoassay for detection of tumor markers.". *Int. J. Mol. Sci.* 11: 5077, 2010.
53. HOSSEINI, S.; VÁZQUEZ-VILLEGAS, P.; RITO-PALOMARES, M. & MARTINEZ-CHAPA, S. O. "Advantages, Disadvantages and Modifications of Conventional ELISA". in *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* 67–115 (Springer, Singapore, 2018).

54. LIU, A.; WANG, K.; WENG, S.; LEI, Y.; LIN, L.; CHEN, W.; LIN, X. & CHEN, Y. "Development of electrochemical DNA biosensors". *TrAC - Trends Anal. Chem.* **37**: 101, 2012.
55. RASOOLY, A. & JACOBSON, J. "Development of biosensors for cancer clinical testing". *Biosens. Bioelectron.* **21**: 1851, 2006.
56. TOTHILL, I. E. "Biosensors for cancer markers diagnosis". *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**: 55, 2009.
57. TALEAT, Z.; KHOSHROO, A. & MAZLOUM-ARDAKANI, M. "Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013)". *Microchim. Acta* **181**: 865, 2014.
58. MEHROTRA, P. "Biosensors and their applications - A review". *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **6**: 153, 2016.
59. BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N. & ESTRELA, P. "Introduction to biosensors.". *Essays Biochem.* **60**: 1, 2016.
60. GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J. & REIMHULT, E. "Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures.". *Sensors (Basel)*. **8**: 1400, 2008.
61. ABDULBARI, H. A. & BASHEER, E. A. M. "Electrochemical Biosensors: Electrode Development, Materials, Design, and Fabrication". *ChemBioEng Rev.* **4**: 92, 2017.
62. HAMMOND, J. L.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P.; CARRARA, S. & TKAC, J. "Electrochemical biosensors and nanobiosensors.". *Essays Biochem.* **60**: 69, 2016.
63. RICCARDI, C. dos S.; COSTA, P. I. da & YAMANAKA, H. "Imunossensor amperométrico". *Quim. Nova* **25**: 316, 2002.
64. GOPINATH, S. C. B.; TANG, T.-H.; CITARTAN, M.; CHEN, Y. & LAKSHMIPRIYA, T. "Current aspects in immunosensors". *Biosens. Bioelectron.* **57**: 292, 2014.
65. RUSLING, J. F. "Nanomaterials-based electrochemical immunosensors for proteins". *Chem. Rec.* **12**: 164, 2012.
66. RICCI, F.; ADORNETTO, G. & PALLESCHI, G. "A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors". *Electrochim. Acta* **84**: 74, 2012.
67. CHIKKAVEERIAH, B. V.; BHIRDE, A. A.; MORGAN, N. Y.; EDEN, H. S. & CHEN, X. "Electrochemical Immunosensors for Detection of Cancer Protein Biomarkers". *ACS Nano* **6**: 6546, 2012.
68. SERAFÍN, V.; EGUÍLAZ, M.; AGÜÍ, L.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & PINGARRÓN, J. M. "An electrochemical immunosensor for testosterone using gold nanoparticles - carbon nanotubes composite electrodes". *Electroanalysis* **23**: 169, 2011.
69. LIN, Y.-Y.; LIU, G.; WAI, C. M. & LIN, Y. "Magnetic beads-based bioelectrochemical immunoassay of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Electrochem. commun.* **9**: 1547, 2007.

70. 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.
71. WANG, H.; WANG, J.; TIMCHALK, C. & LIN, Y. "Magnetic electrochemical immunoassays with quantum dot labels for detection of phosphorylated acetylcholinesterase in plasma.". *Anal. Chem.* **80**: 8477, 2008.
72. NIKOLELI, G.-P.; SIONTOROU, C.; NIKOLELIS, D.; BRATAKOU, S.; KARAPETIS, S.; TZAMTZIS, N.; NIKOLELI, G.-P.; SIONTOROU, C. G.; NIKOLELIS, D. P.; BRATAKOU, S.; KARAPETIS, S. & TZAMTZIS, N. "Biosensors Based on Lipid Modified Graphene Microelectrodes". *C* **3**: 9, 2017.
73. HOLZINGER, M.; LE GOFF, A. & COSNIER, S. "Nanomaterials for biosensing applications: a review". *Front. Chem.* **2**: 63, 2014.
74. AHIRWAL, G. K. & MITRA, C. K. "Gold nanoparticles based sandwich electrochemical immunosensor". *Biosens. Bioelectron.* **25**: 2016, 2010.
75. VIDOTTI, M.; CARVALHAL, R. F.; MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M. & KUBOTA, L. T. "Biosensors Based on Gold Nanostructures". *J. Braz. Chem. Soc.* **22** (1): 3-20, 2011.
76. ULIANA, C. V.; PEVERARI, C. R.; AFONSO, A. S.; COMINETTI, M. R. & FARIA, R. C. "Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker". *Biosens. Bioelectron.* **99**: 156, 2018.
77. SURESH, L.; BRAHMAN, P. K.; REDDY, K. R. & J.S., B. "Development of an electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles incorporated chitosan biopolymer nanocomposite film for the detection of prostate cancer using PSA as biomarker". *Enzyme Microb. Technol.* **112**: 43, 2018.
78. FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A. & KUBOTA, L. T. "Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos". *Quim. Nova* **26**: 381, 2003.
79. GOODING, J. J. & DARWISH, N. "The rise of self-assembled monolayers for fabricating electrochemical biosensors-an interfacial perspective". *Chem. Rec.* **12**: 92, 2012.
80. PARK, C. S.; COLORADO, R.; JAMISON, A. C. & LEE, T. R. "Thiol-Based Self-Assembled Monolayers: Formation, Organization, and the Role of Adsorbate Structure". *Ref. Modul. Mater. Sci. Mater. Eng.*, 2016.
81. MIRSKY, V. M. "New electroanalytical applications of self-assembled monolayers". *TrAC Trends Anal. Chem.* **21**: 439, 2002.
82. CARVAJAL, S.; FERA, S. N.; JONES, A. L.; BALDO, T. A.; MOSA, I. M.; RUSLING, J. F. & KRAUSE, C. E. "Disposable inkjet-printed electrochemical platform for detection of clinically relevant HER-2 breast cancer biomarker". *Biosens. Bioelectron.* **104**: 158, 2018.

83. SOARES, A. C.; SOARES, J. C.; SHIMIZU, F. M.; RODRIGUES, V. da C.; AWAN, I. T.; MELENDEZ, M. E.; PIAZZETTA, M. H. O.; GOBBI, A. L.; REIS, R. M.; FREGNANI, J. H. T. G.; CARVALHO, A. L. & OLIVEIRA, O. N. "A simple architecture with self-assembled monolayers to build immunosensors for detecting the pancreatic cancer biomarker CA19-9". *Analyst* **143**: 3302, 2018.
84. MORAES SILVA, S.; TAVALLAIE, R.; SANDIFORD, L.; TILLEY, R. D. & GOODING, J. J. "Gold coated magnetic nanoparticles: from preparation to surface modification for analytical and biomedical applications". *Chem. Commun.* **52**: 7528, 2016.
85. ŠTOFIK, M.; STRÝHAL, Z. & MALÝ, J. "Dendrimer-encapsulated silver nanoparticles as a novel electrochemical label for sensitive immunosensors". *Biosens. Bioelectron.* **24**: 1918, 2009.
86. CENTI, S.; LASCHI, S. & MASCINI, M. "Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads". *Talanta* **73**: 394, 2007.
87. CHIKKAVEERIAH, 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**(11):4477-83, 2011.
88. OTIENO, B. A.; KRAUSE, C. E.; LATUS, A.; CHIKKAVEERIAH, 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.
89. DING, C.; ZHANG, Q. & ZHANG, S. "An electrochemical immunoassay for protein based on bio bar code method". *Biosens. Bioelectron.* **24**: 2434, 2009.
90. FU, X.-H. "Magnetic-controlled non-competitive enzyme-linked voltammetric immunoassay for carcinoembryonic antigen". *Biochem. Eng. J.* **39**: 267, 2008.
91. XU, Y. & WANG, E. "Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles". *Electrochim. Acta* **84**: 62, 2012.
92. MAO, X.; JIANG, J.; HUANG, Y.; SHEN, G. & YU, R. "Gold nanoparticle accumulation using magnetic particles: A new strategy for electrochemical immunoassay based on the reversible reaction between dethiobiotin and avidin". *Sensors Actuators B Chem.* **123**: 198, 2007.
93. 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.
94. NIKOLELIS, D. P.; HIANIK, T. & NIKOLELI, G.-P. "Stabilized Lipid Films in Electrochemical Biosensors". *Electroanalysis* **22**: 2747, 2010.
95. SRIRAMAN, S. K.; GERALDO, V.; LUTHER, E.; DEGTEREV, A. & TORCHILIN, V. "Cytotoxicity of PEGylated liposomes co-loaded with novel pro-apoptotic drug NCL-240 and the MEK inhibitor cobimetinib against colon carcinoma in vitro". *J. Control. Release* **220**: 160, 2015.

96. HIANIK, T.; ŠNEJDÁRKOVÁ, M.; SOKOLÍKOVÁ, L.; MESZÁR, E.; KRIVÁNEK, R.; TVAROŽEK, V.; NOVOTNÝ, I. & WANG, J. "Immunosensors based on supported lipid membranes, protein films and liposomes modified by antibodies". *Sensors Actuators B Chem.* **57**: 201, 1999.
97. DERKUS, B. "Applying the miniaturization technologies for biosensor design". *Biosens. Bioelectron.* **79**: 901, 2016.
98. SINGH, M.; HAVERINEN, H. M.; DHAGAT, P. & JABBOUR, G. E. "Inkjet Printing-Process and Its Applications". *Adv. Mater.* **22**: 673, 2010.
99. YAMANAKA, K.; VESTERGAARD, M. & TAMIYA, E. "Printable Electrochemical Biosensors: A Focus on Screen-Printed Electrodes and Their Application". *Sensors* **16**: 1761, 2016.
100. WU, L. & QU, X. "Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges". *Chem. Soc. Rev.* **44**: 2963, 2015.
101. NASCIMENTO, V. B. & ANGNES, L. "Eletrodos fabricados por silk-screen". *Quím. Nov.* **21** (5): 614-629, 1998.
102. RAMA, E. C. & COSTA-GARCÍA, A. "Screen-printed Electrochemical Immunosensors for the Detection of Cancer and Cardiovascular Biomarkers". *Electroanalysis* **28**: 1700, 2016.
103. ARDUINI, F.; MICHELI, L.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; PIERMARINI, S.; RICCI, F. & VOLPE, G. "Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis". *TrAC Trends Anal. Chem.* **79**: 114, 2016.
104. 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.
105. AND, M. Z. & HUANG, X. "Nanoparticles Comprising a Mixed Monolayer for Specific Bindings with Biomolecules†". *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 12047, 2004.
106. WANG, C.; YAN, Q.; LIU, H.-B.; ZHOU, X.-H. & XIAO, S.-J. "Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions". *Langmuir* **27**: 12058, 2011.
107. MALHOTRA, R.; PATEL, V.; CHIKKAVEERIAIAH, 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.
108. MALHOTRA, R.; PATEL, V.; VAQUÉ, J. P.; GUTKIND, J. S. & RUSLING, J. F. "Ultrasensitive electrochemical immunosensor for oral cancer biomarker IL-6 using carbon nanotube forest electrodes and multilabel amplification". *Anal. Chem.* **82**: 3118, 2010.
109. RYAN, B. J. & PODUSKA, K. M. "Roughness effects on contact angle measurements". *Am. J. Phys.* **76** (11):1074-1077, 2008.
110. NJOBUENWU, D. "Determination of contact angle from contact area of liquid droplet spreading on solid substrate". *Leonardo El J Pract Techno.*, **6** (10):29-38, 2007.

111. SHENG, Y. J.; JIANG, S. & TSAO, H. K. "Effects of geometrical characteristics of surface roughness on droplet wetting". *J. Chem. Phys.* **127**: 234704, 2007.
112. POETES, R.; HOLTZMANN, K.; FRANZE, K. & STEINER, U. "Metastable underwater superhydrophobicity". *Phys. Rev. Lett.* **105** (16):166104, 2010.
113. RUSLING, J. F. & ITO, K. "Voltammetric determination of electron-transfer rate between an enzyme and a mediator". *Anal. Chim. Acta* **252**: 23, 1991.
114. REY, E. G.; O'DELL, D.; MEHTA, S. & ERICKSON, D. "Mitigating the Hook Effect in Lateral Flow Sandwich Immunoassays Using Real-Time Reaction Kinetics". *Anal. Chem.* **89**: 5095, 2017.
115. DONG, Y.; ZHAO, S.; LI, Z.; YUE, H.; WANG, Y.; DENG, L. & ZHANG, S. "A novel immunosensor based on chitosan-Prussian blue-graphene nanocomposite and au nanoparticle for rapid detection of melamine". *Int. J. Electrochem. Sci.* **11**: 1765-1776, 2016.
116. HWANG, D.; BYRNE, J.; SCOLLARD, D. & LEVINE, E. "Expression of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 in Human Breast Cancer". *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **90**: 455, 1998.
117. MARTINEZ, J.; GEORGOFF, I. & LEVINE, A. J. "Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein". *Genes & development*, **5** (2):151-159, 1991.
118. "Chapter 8 Kinetics and nature of antibody-antigen interactions". *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* **15**: 123, 1985.
119. THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R. & WOOD, R. Resulting from the Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories. *Pure Appl. Chem* **74**:835-855,2002.
120. XIANYU, Y.; WANG, Q. & CHEN, Y. "Magnetic particles-enabled biosensors for point-of-care testing". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* **106**: 213-224, 2018.
121. PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & GONZÁLEZ-CORTÉS, A. "Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors". *Electrochim. Acta.* **53** (19): 5848-5866, 2008.
122. MANI, V.; CHIKKAVEERIAH, 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.
123. GLASSMAN, P. M. & BALTHASAR, J. P. "Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy". *Cancer Biology & Medicine.* **11** (1): 20–33, 2014.
124. NOAH, N. M.; MWILU, S. K.; SADIK, O. A.; FATAH, A. A. & ARCILESI, R. D. "Immunosensors for quantifying cyclooxygenase 2 pain biomarkers". *Clin. Chim. Acta.* **412** (15-16):1391-1398 , 2011.

125. NOAH, N. M.; MARCELLS, O.; ALMALLETI, A.; LIM, J. & SADIK, O. A. "Metal Enhanced Electrochemical Cyclooxygenase-2 (COX-2) Sensor for Biological Applications". *Electroanalysis* **23**: 2392, 2011.
126. OMOLE, M. A.; NOAH, N.; ZHOU, L.; ALMALETTI, A.; SADIK, O. A.; ASEMOTA, H. N.; WILLIAM, E. S. & GILCHRIST, J. "Spectroelectrochemical characterization of pain biomarkers". *Anal. Biochem.* **395**: 54, 2009.
127. PEDRERO, M.; DE VILLENA, F. J. M.; MUÑOZ-SAN MARTÍN, C.; CAMPUZANO, S.; GARRANZO-ASENSIO, M.; BARDERAS, R. & PINGARRÓN, J. M. Disposable "Amperometric immunosensor for the determination of human p53 protein in cell lysates using magnetic micro-carriers". *Biosensors* **6** (4): 56, 2016.
128. STEFAN-VAN STADEN, R.-I.; AL-OGAIDI, A. J. M.; GUGOASA, L. A.; YANIK, H.; GÖKSEL, M. & DURMUŞ, M. "Determination of p53 Using Graphite Based Amperometric Sensors". *J. Electrochem. Soc.* **164**: B502, 2017.
129. CHEN, A.; BAO, Y.; GE, X.; SHIN, Y.; DU, D. & LIN, Y. "Magnetic particle-based immunoassay of phosphorylated p53 using protein cage templated lead phosphate and carbon nanospheres for signal amplification". *RSC Adv.* **2**: 11029-11034, 2012.
130. KULKARNI, S.; RADER, J. S.; ZHANG, F.; LIAPIS, H.; KOKI, A. T.; MASFERRER, J. L.; SUBBARAMAIAH, K. & DANNENBERG, A. J. "Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer". *Clin. Cancer Res.* **7**: 429, 2001.
131. ZYKOVA, T. A.; ZHU, F.; ZHAI, X.; MA, W.-Y.; ERMAKOVA, S. P.; LEE, K. W.; BODE, A. M. & DONG, Z. "Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis". *Mol. Carcinog.* **47**: 797, 2008.
132. ELDER, D. J.; HALTON, D. E.; HAGUE, A. & PARASKEVA, C. "Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression.". *Clin. Cancer Res.* **3**: 1679, 1997.
133. SALDIVAR, J. S.; LOPEZ, D.; FELDMAN, R. A.; THARAPPEL-JACOB, R.; DE LA ROSA, A.; TERREROS, D. & BALDWIN, W. S. "COX-2 overexpression as a biomarker of early cervical carcinogenesis: A pilot study". *Gynecol. Oncol.* **107** (1): S155-S162, 2007.
134. JAWANJAL, P.; SALHAN, S.; DHAWAN, I.; DAS, N.; AGGARWAL, R.; TRIPATHI, R. & RATH, G. "Augmented Activity of Cyclooxygenase-2 in Tissue and Serum of Patients With Cervical Cancer". *J. Clin. Lab. Anal.* **30**: 1198, 2016.
135. KASTENHUBER, E. R. & LOWE, S. W. "Putting p53 in Context". *Cell.* **170**(6):1062-1078 , 2017.
136. JENSEN, G. C.; KRAUSE, C. E.; SOTZING, G. A. & RUSLING, J. F. "Inkjet-printed gold nanoparticle electrochemical arrays on plastic. Application to immunodetection of a cancer biomarker protein". *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**: 4888, 2011.

137. CAMERON, R. I.; MAXWELL, P.; JENKINS, D. & MCCLUGGAGE, W. G. "Immunohistochemical staining with MIB1, bcl2 and p16 assists in the distinction of cervical glandular intraepithelial neoplasia from tubo-endometrial metaplasia, endometriosis and microglandular hyperplasia". *Histopathology* **39**: 21, 2002.
138. YOKCHOM, R.; LAIWEJPITHAYA, S.; MANEEPRAKORN, W.; TAPANEEYAKORN, S.; RABABLERT, J. & DHARAKUL, T. "Paper-based immunosensor with signal amplification by enzyme-labeled anti-p16INK4a multifunctionalized gold nanoparticles for cervical cancer screening". *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **14**: 1051, 2018.
139. YANG, L.; HUANG, X.; SUN, L. & XU, L. "A piezoelectric immunosensor for the rapid detection of p16INK4a expression in liquid-based cervical cytology specimens". *Sensors Actuators B Chem.* **224**: 863, 2016.
140. DUANGKAEW, P.; TAPANEEYAKORN, S.; APIWAT, C.; DHARAKUL, T.; LAIWEJPITHAYA, S.; KANATHARANA, P. & LAOCHAROENSUK, R. "Ultrasensitive electrochemical immunosensor based on dual signal amplification process for p16INK4a cervical cancer detection in clinical samples". *Biosens. Bioelectron.* **74**: 673, 2015.
141. JUNG, J. E.; TOMASICH, F. D. S.; CARVALHO, N. S. de; MAESTRI, C. A. & FONSECA, F. V. "The role of P16ink4a and P53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment". *Rev. Col. Bras. Cir.* **43**: 35, 2016.
142. FERREIRA, G. R.; SEGURA, T.; DE SOUZA, F. G.; UMPIERRE, A. P. & MACHADO, F. "Synthesis of poly(vinyl acetate)-based magnetic polymer microparticles". *Eur. Polym. J.* **48**: 2050, 2012.
143. PROENÇA, C. A.; BALDO, T. A.; FREITAS, T. A.; MATERÓN, E. M.; WONG, A.; DURÁN, A. A.; MELENDEZ, M. E.; ZAMBRANO, G. & FARIA, R. C. "Novel enzyme-free immunomagnetic microfluidic device based on Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe₂O₄ for cancer biomarker detection". *Anal. Chim. Acta* **1071**: 59, 2019.
144. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, R.; ESTELRICH, J. & BUSQUETS, M. A. "Liposomes Loaded with Hydrophobic Iron Oxide Nanoparticles: Suitable T₂ Contrast Agents for MRI.". *Int. J. Mol. Sci.* **17**: 2016.
145. DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; MALTEZ-DA COSTA, M. & MERKOÇI, A. "Controlling the electrochemical deposition of silver onto gold nanoparticles: Reducing interferences and increasing the sensitivity of magnetoimmuno assays". *Biosens. Bioelectron.* **24**: 2475, 2009.
146. TRAN, M.; DEPENNING, R.; TURNER, M. & PADALKAR, S. "Effect of citrate ratio and temperature on gold nanoparticle size and morphology". *Mater. Res. Express* **3**: 105027, 2016.
147. ALONSO, J.; KHURSHID, H.; DEVKOTA, J.; NEMATI, Z.; KHADKA, N. K.; SRIKANTH, H.; PAN, J. & PHAN, M.-H. "Superparamagnetic nanoparticles encapsulated in lipid vesicles for advanced magnetic hyperthermia and biodetection". *J. Appl. Phys.* **119**: 083904, 2016.

148. WANG, Y.; QU, Y.; YE, X.; WU, K. & LI, C. "Fabrication of an electrochemical immunosensor for α -fetoprotein based on a poly-L-lysine-single-walled carbon nanotubes/Prussian blue composite film interface". *J. Solid State Electrochem.* **20**: 2217, 2016.
149. EZZATI NAZHAD DOLATABADI, J.; VALIZADEH, H. & HAMISHEHKAR, H. "Solid Lipid Nanoparticles as Efficient Drug and Gene Delivery Systems: Recent Breakthroughs.". *Adv. Pharm. Bull.* **5**: 151, 2015.
150. CIVIT, L.; FRAGOSO, A. & O'SULLIVAN, C. K. "Electrochemical biosensor for the multiplexed detection of human papillomavirus genes". *Biosens. Bioelectron.* **26**: 1684, 2010.
151. JIMENEZ, A. M. J.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; DOSTALOVA, S.; KREJCOVA, L.; MICHALEK, P.; RICHTERA, L. & ADAM, V. "Specific magnetic isolation of E6 HPV16 modified magnetizable particles coupled with PCR and electrochemical detection". *Int. J. Mol. Sci.* **17**: 585, 2016.