

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

BEATRIZ GUSSON

**Biossensor eletroquímico para detecção de vesículas extracelulares
pequenas provenientes de câncer de mama**

São Carlos

2022

BEATRIZ GUSSON

**Biossensor eletroquímico para detecção de vesículas extracelulares
pequenas provenientes de câncer de mama**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Bacharelado
em Biotecnologia da Universidade
Federal de São Carlos, para obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Isabella Sampaio do
Nascimento

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria
Cristina da Silva Pranchevicius

São Carlos

2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Elisabete, que sempre me inspiraram, me apoiaram e acreditaram em mim. Obrigada por todo o amor, compreensão e trabalho para chegarmos até aqui, por sempre me mostrarem o lado bom e me ajudarem a seguir em frente.

Ao meu irmão, Rafael, por dividir a vida comigo desde sempre.

Aos meus avós paternos, Milton e Lúcia, por acreditarem no meu potencial e no meu trabalho mesmo sem compreenderem muitas vezes. Aos meus avós maternos, José e Maria José, que me acompanham de outro plano. Nada disso teria sido possível sem que vocês tivessem dado o primeiro passo.

À toda minha família, vocês são a base e a motivação de tudo.

Aos meus grandes amigos da faculdade que levarei pela vida, Iara Ciancaglini, Júlia Dias, Matheus Pintor, Matheus Rozeno e Sofia Dallasta. Os momentos divididos com vocês foram únicos, obrigada por todo companheirismo, amizade e por compartilharem comigo o amor pela ciência.

Aos meus companheiros de laboratório, Juliana Naomi, Nayla Takeuti, Felipe Quatroni e Vinícius Cauan, por terem dividido todas as experiências no laboratório, solucionando os desafios e comemorando as vitórias.

À minha orientadora, Isabella Sampaio, por todos os ensinamentos, paciência e exemplo. Obrigada por ter aceitado o desafio desse projeto.

A todos os membros do laboratório GNano (IFSC/USP). À equipe técnica Bruna, Simone e Romeu. Ao professor Valtencir Zucolotto, por ter aberto as portas do laboratório para mim. À Paula Pincela, por toda a ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

À minha co-orientadora, Maria Cristina Pranchevicius.

Ao curso de Biotecnologia da UFSCar. Ao secretário Rodrigo e à coordenadora Andrea Fuentes. A todos os professores e técnicos que contribuíram para a minha formação como Biotecnologista.

RESUMO

GUSSON, B. **Biossensor eletroquímico para detecção de vesículas extracelulares pequenas provenientes de câncer de mama.** 2022. 53 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.

O câncer é um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação desordenada das células, podendo invadir outros órgãos e tecidos. O câncer de mama (CM) é a doença mais incidente em mulheres no mundo todo, com mais de 2 milhões de casos e 685 mil mortes pela doença em 2020. O diagnóstico no estágio inicial da doença é um fator crucial para aumentar as chances de sobrevivência do paciente. Atualmente, o diagnóstico é feito por mamografia e biópsia do tecido. Entretanto, esses métodos requerem infraestrutura laboratorial e recursos humanos especializados, tornando o processo caro e demorado. Por esse motivo, novos biomarcadores estão sendo investigados para o diagnóstico da doença, como a proteína Del-1 presente em vesículas extracelulares pequenas (SEVs) provenientes de células mamárias tumorais. Nesse projeto, propõe-se um sistema de detecção de SEVs para o diagnóstico de câncer de mama. Eletrodos de ouro foram modificados com anticorpos contra a proteína CD63, presente em SEVs gerais para a captura das mesmas. Uma segunda etapa consiste em funcionalizar nanopartículas de ouro (AuNps) com anticorpos anti-Del-1, utilizadas para a marcação das SEVs provenientes de células cancerosas. As etapas foram monitoradas pela técnica de impedância eletroquímica. Foram cultivadas células cancerosas de mama e pulmão; suas SEVs foram extraídas por ultracentrifugação e quantificadas por NTA. Esperava-se obter um sistema capaz de detectar o CM de forma não invasiva e *point-of-care* através de um imunossensor sensível, rápido e de baixo custo. Entretanto, nenhuma das diferentes estratégias utilizadas foi capaz de detectar as SEVs. O trabalho contribui com um novo questionamento acerca da localização celular do biomarcador Del-1 e aponta análises que ainda são necessárias para que essa proteína seja explorada para o diagnóstico de câncer de mama.

Palavras-chave: Biossensor. Vesículas extracelulares pequenas. Câncer de mama. Del-1.

ABSTRACT

GUSSON, B. **Development of electrochemical biosensor for detection of small extracellular vesicles (SEVs) from breast cancer cells.** 2022. 53 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.

Cancer is a group of diseases characterized by the disordered proliferation of cells, which can invade other organs and tissues. Breast cancer (BC) is the most common disease in women worldwide, with more than 2 million cases and 685,000 deaths from the disease in 2020. Diagnosis at an early stage of the disease is a crucial factor to increase the chances of breast cancer patient survival. Currently, diagnosis is performed by mammography and tissue biopsy. However, these methods require laboratory infrastructure and specialized human resources, making the process expensive and time-consuming. For this reason, new biomarkers are being investigated for the diagnosis of the disease, such as the Del-1 protein present in small extracellular vesicles (SEVs) from breast tumor cells. In this project, a system for the detection of SEVs is proposed for the diagnosis of breast cancer. Gold electrodes were modified with antibodies against the CD63 protein, present in general SEVs, to capture them. A second step consists of functionalizing gold nanoparticles (AuNps) with anti-Del1 antibodies, used for labeling SEVs from cancer cells. The steps were monitored by electrochemical impedance technique. Breast and lung cancer cells were cultured; their SEVs were extracted by ultracentrifugation and quantified by NTA. It was aimed to obtain a system capable of detecting CM in a non-invasive and point-of-care way through a sensitive, fast, and low-cost immunosensor. However, none of the different strategies used was able to detect the SEVs. This work contributes to a new questioning about the cellular location of the Del-1 biomarker and points out analyzes that are still necessary for this protein to be explored for the diagnosis of breast cancer.

Key-words: Biosensor. Small extracellular vesicles. Breast cancer. Del-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do sistema de detecção. A população geral de SEVs capturada a partir do CD63 e as vesículas Del1 positivas identificadas pelas nanopartículas funcionalizadas com o respectivo anticorpo.	25
Figura 2	(A) Aparato para realizar as medidas eletroquímicas no Autolab, com suporte de contato acoplado ao potenciostato. (B) Suporte para o eletrodo, com adesivos para delimitar a área disponível para solução eletrolítica. (C) Eletrodos de ouro multiplex descartáveis contendo 4 eletrodos de trabalho, 1 contra-eletrodo e 2 eletrodos de referência.	28
Figura 3	(A) Gráfico da concentração (partículas/mL) pelo tamanho (nm) das SEVs extraídas das linhagens A549 e (B) MCF7, com o tamanho médio indicado em cada pico e, em vermelho, a faixa de erro.	30
Figura 4	Voltamograma indicando 5 ciclos de medidas de CV para limpeza do eletrodo de ouro com ácido sulfúrico, sendo possível observar os 3 picos de oxidação do ouro.	31
Figura 5	(A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo limpo com ácido sulfúrico e (B) com limpeza alcoólica após as etapas de funcionalização com cisteamina (Cist), glutaraldeído (Glu), anticorpos anti-CD63 (Ab), BSA e detecção de SEVs a 10 ⁸ partículas/mL. (C) Gráfico de barras representando a variação percentual do RCT após a incubação com as SEVs para eletrodos submetidos a limpezas ácida (em laranja) e alcoólica (em lilás), com desvio padrão entre as réplicas (n=4) indicado.	32
Figura 6	(A) Diagrama de Nyquist para as etapas de funcionalização e detecção de SEVs a 10 ⁸ partículas/mL em eletrodo modificado com os conjuntos MPA-EDC-NHS e (B) cisteamina-glutaraldeído. (C) Gráfico de barras representando a porcentagem de variação do Rct entre os eletrodos modificados com MPA (em verde) e Cisteamina (em rosa), com desvio padrão entre as réplicas (n=4) indicado.	34
Figura 7	(A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo modificado e incubado com diferentes concentrações de SEVs. (B) Gráfico de barras representando a porcentagem do ΔRct na detecção de SEVs em diferentes concentrações, com desvio padrão entre as réplicas (n=3) indicado.	35
Figura 8	(A) Diagrama de Nyquist antes e após etapa de detecção com SEVs a 10 ² , (B) 10 ⁵ , (C) e 10 ⁸ partículas/mL. (D) Gráfico de barras representando a porcentagem do ΔRct na detecção de SEVs em diferentes concentrações, com desvio padrão entre as réplicas (n=3) indicado.	36
Figura 9	(A) Célula eletroquímica utilizada para realizar as medidas. (B) Eletrodos utilizados: eletrodo de trabalho (1), eletrodo de referência (2) e contra-eletrodo (3).	37

Figura 10	Voltamograma indicando o último ciclo de CV a 100 mV/s para limpeza do eletrodo de ouro com ácido sulfúrico, sendo possível observar os 3 picos de oxidação do ouro.	37
Figura 11	(A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo de barra modificado para detecção direta das SEVs por Del-1. (B) Dotplot representando a porcentagem do ΔR_{ct} em função das réplicas nos eletrodos modificados com cisteamina e incubados com SEVs a 10^7 partículas/mL, com média, desvio padrão e desvio padrão relativo indicados.	38
Figura 12	(A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo de barra com incubação de 3 h com os anticorpos e 1 h com a amostra controle. (B) Gráfico de barras representando a porcentagem do ΔR_{ct} entre a incubação com a amostra controle (em azul) e a amostra real, contendo SEVs a 10^7 partículas/mL (em amarelo), com desvio padrão entre as réplicas (n=3) indicado.	39
Figura 13	(A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo de barra modificados com MUA. (B) Gráfico de barras representando a porcentagem do ΔR_{ct} entre a amostra controle (em azul) e a amostra real, contendo SEVs a 10^7 partículas/mL (em amarelo), com desvio padrão entre as réplicas (n=2) indicado.	40
Figura 14	Diagrama de Nyquist para a construção do biossensor com cisteamina 0,5 M, anticorpos anti Del-1 100 μ g/mL pré-ativados com EDC 8 mM e NHS 5 mM, e BSA 1%.	40
Figura 15	(A) Diagrama de Nyquist para as etapas antes e após detecção das SEVs MCF7 íntegras e (B) lisadas por sonicação, com ΔR_{ct} entre as etapas indicado.	42
Figura 16	(A) Diagrama de Nyquist antes e após a etapa de detecção das SEVs MCF7 com incubação por 30 min e (B) 1 h, com ΔR_{ct} entre as etapas indicado.	43
Figura 17	(A) Diagrama de Nyquist antes e após a etapa de detecção com incubação de 1 hora das SEVs lisadas de MCF7 e (B) A549, com ΔR_{ct} entre as etapas indicado.	43
Figura 18	(A) Diagrama de Nyquist antes e após a etapa de detecção das SEVs MCF7 em SAM construída com cisteamina e (B) MPA, com ΔR_{ct} entre as etapas indicado.	43
Figura 19	(A) Diagrama de Nyquist antes e após a etapa de detecção das SEVs MCF7 e (B) A549, em SAM construída com MPA. (C) Gráfico de barras para a detecção das SEVs das duas linhagens, com desvio padrão entre as réplicas (n=3) indicado.	44
Figura 20	(A) Gráfico da concentração (partículas/mL) pelo tamanho (nm) das SEVs MCF7 antes e (B) após sonicação, e (C) SEVs A549 antes e (D) após sonicação, com o tamanho médio indicado em cada pico e, em vermelho, a faixa de erro.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação de diferentes metodologias para a detecção de SEVs.	21
Tabela 2	Valores de tamanho e concentração para as SEVs de MCF7 e A549 antes e após sonicação obtidos na análise por NTA.	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Câncer de mama	12
1.1.1 Características da doença	12
1.1.2 Biomarcadores.....	13
1.2 Vesículas extracelulares pequenas (SEVs)	15
1.3 Biossensores	16
1.3.1 Biossensores para SEVs.....	19
1.3.2 Medidas eletroquímicas.....	22
1.4 Nanomateriais	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 MATERIAIS E METODOLOGIA	25
3.1 Materiais	26
3.1.1 Soluções	26
3.2 Metodologia.....	26
3.2.1 Cultivo celular.....	27
3.2.2 Extração das SEVs	27
3.2.3 Eletrodos descartáveis de ouro.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Extração das SEVs.....	29
4.2 Eletrodos descartáveis de ouro	30
4.2.1 Limpeza	30
4.2.2 Detecção de SEVs totais por CD63	32
4.2.3 Detecção de SEVs tumorais por Del-1	36
5 CONCLUSÃO.....	45
6 REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

1.1.1 Características da doença

O câncer é um grupo de doenças heterogêneas tanto do ponto de vista molecular, por apresentar diferentes assinaturas genéticas, quando fenotipicamente, devido a variedade morfológica e diferentes manifestações clínicas, caracterizado pela proliferação desordenada das células (HARBECK *et al.*, 2019; INCA, 2021). Quando essa proliferação se dá na região das mamas, a doença denomina-se câncer de mama (CM), podendo ser carcinoma ductal, originado nos ductos mamários e prevalecente em 85% dos casos, ou carcinoma lobular, originado nos lóbulos que são responsáveis pela produção de leite materno, diagnosticado em 15% dos casos (WHO, 2021). Os tumores que expressam receptores de estrógeno (ER) e/ou de progesterona (PR) são considerados positivos para receptores hormonais, enquanto que os sem a expressão de ER, PR ou receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) são os chamados triplo negativo (HARBECK *et al.*, 2019). No início, a proliferação das células fica concentrada na região dos ductos ou lóbulos (câncer *in situ*), com baixa capacidade de entrar em metástase e se disseminar. Com o tempo, o câncer pode passar a ser infiltrante e suas células invadem áreas ao redor, se espalhando para outros tecidos mamários, linfonodos ou demais órgãos do corpo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; WHO, 2021).

O câncer de mama é a doença mais incidente em mulheres no mundo todo (HARBECK *et al.*, 2019), com mais de 2 milhões de casos notificados e 685 mil mortes pela doença em 2020 (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, é o segundo tipo de câncer mais incidente no gênero feminino, atrás apenas do câncer de pele não melanoma; estima-se que sejam notificados 66.280 novos casos a cada ano entre 2020 e 2022 (INCA, 2019). A doença se enquadra como uma doença feminina devido à baixa recorrência em homens: apenas 1% do total de casos são observados em indivíduos do gênero masculino, sendo que 1 a cada 1000 homens apresenta o risco de desenvolver a doença, contrapondo com o risco em mulheres, de 1 a cada 8 (GIORDANO, 2018).

O principal sintoma da doença é o endurecimento do nódulo mamário, geralmente indolor, mas também pode ser observado endurecimento de partes das mamas,

mudanças na pele, saída espontânea de líquido do mamilo, vermelhidão ou mudança na posição ou formato do mamilo, e nódulo no pescoço ou nas axilas. A mamografia é um exame por imagem capaz de detectar os nódulos e vem sendo usada como método de diagnóstico desde 1976. Além dela, outros métodos são o exame clínico das mamas, capaz de detectar tumores superficiais a partir de 1 cm pela apalpação das mamas por um profissional; a ultrassonografia, que avalia a forma e consistência das mamas e diferencia os nódulos sólidos dos cistos; e a ressonância nuclear magnética, que produz imagens do corpo humano por meio de um campo magnético, sem uso de radiação, usado de forma complementar aos outros exames (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; HERBECK *et al.*, 2019). Apesar disso, o câncer de mama só é realmente confirmado pela biópsia do tecido, para a qual é necessária a retirada do nódulo suspeito – ou um pedaço dele – por meio de uma pequena cirurgia ou de punções por agulha fina, grossa ou mamotomia, e o material segue para análise por um patologista (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; APANTAKU, 2000).

O processo de diagnóstico torna-se demorado e custoso devido a necessidade de infraestrutura laboratorial e mão de obra especializada, mas é de suma importância para garantir a sobrevivência do paciente, uma vez que, quando diagnosticado em estágios iniciais, apresenta chances de cura em 70-80% dos casos (HERBECK *et al.*, 2019). Por este motivo, processos alternativos estão sendo investigados, como é o caso de diferentes biossensores que foram desenvolvidos recentemente com a finalidade de detectar biomarcadores relacionados à doença (YANG *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020), indicando a relevância atual do assunto.

1.1.2 Biomarcadores

Biomarcadores são moléculas biológicas encontradas em fluidos corporais ou em tecidos, e são sinais de processos normais, anormais, ou de condições de doença, como câncer. Há alterações significativas de seus níveis entre indivíduos doentes e saudáveis, as quais podem ser devido à diferentes fatores, como mutações, variações transcricionais e modificações pós traducionais. Um biomarcador pode ser tanto uma biomolécula, como proteínas, ácidos nucleicos, anticorpos e peptídeos, quanto um conjunto de alterações, como variações na expressão gênica, proteômica e/ou metabolômica (HENRY; HAYES, 2012).

No que diz respeito a biomarcadores para CM, alguns genes podem ser utilizados para indicar uma predisposição genética em se desenvolver a doença. Apesar de diversos genes estarem envolvidos no processo, os mais bem caracterizados são BRCA1 e BRCA2, genes supressores de tumor envolvidos no reparo de quebras da dupla fita de DNA que desempenham um papel crítico na manutenção da integridade do material genético (ROY; CHUN; POWELL, 2012). Estudos apontam que o risco cumulativo de desenvolver a doença aos 70 anos é de 60% para os portadores de BRCA1 e de 55% para os de BRCA2 (MAVADDAT *et al.*, 2013). O teste genético para identificação dos genes BRCA1/2 são comuns e recomendados para avaliação do risco em famílias com histórico recorrente da doença, mas não são indicados para mulheres sem histórico familiar (MOYER, 2014).

Para o diagnóstico da doença em si, o antígeno de câncer 15-3 (CA 15-3) é amplamente utilizado para pacientes com a doença em metástase. Trata-se de uma molécula detectora de formas solúveis da proteína Mucina 1 (MUC-1), cujos níveis estão aumentados na doença (CHEUNG; GRAVES; ROBERTSON, 2000). Entretanto, sua sensibilidade é de apenas 60-70%, e seus níveis séricos raramente aumentam em pacientes com a doença em estágio inicial (DUFFY; EVOY; MCDERMOTT, 2010; MOON *et al.*, 2016).

O receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) é superexpresso em vários tipos de câncer, incluindo o de mama, e atua em diferentes funções tumorais, como proliferação e migração das células (DOI *et al.*, 2017). Sua superexpressão está correlacionada à progressão e agressividade da doença e, por isso, sua detecção é utilizada para determinar o prognóstico do paciente e indicar a melhor opção de tratamento (ROSS *et al.*, 2003).

Os microRNAs também vem sendo cogitados como biomarcadores para o câncer de mama. Eles são pequenas moléculas de RNA não codificante capazes de se ligar por complementariedade aos RNAs mensageiros e regular sua tradução (HE; HANNON, 2004). Em diversos tipos de câncer ocorrem alterações na expressão de microRNAs, relacionando-os ao desenvolvimento, progressão e resposta do tumor à terapia. Dessa forma, essas moléculas podem ser utilizadas como biomarcadores para diagnósticos e prognósticos (IORIO; CROCE 2012). Jang e colaboradores indicaram que a detecção

combinada de 4 microRNAs (miR-1246, miR-206, miR-24 e miR-373) demonstrou sensibilidade de 98% em detectar o câncer de mama, com grande potencial de auxiliar no diagnóstico por mamografia (JANG *et al.*, 2021). Além desses, os microRNAs miR-21 e miR-210 são regulados positivamente na doença, enquanto que miR-195 e miR-497 estão suprimidos, adicionando-os à lista de possíveis alvos para diagnóstico (ADHAMI *et al.*, 2018).

Recentemente, Moon e colaboradores descreveram a proteína Del-1 (do inglês, *Developmental endothelial locus-1*), expressa em vesículas extracelulares, como sendo um potencial biomarcador para CM (MOON *et al.*, 2016), a qual se encontra em concentrações significativamente elevadas nas vesículas de pacientes com a doença (WANG *et al.*, 2018). Também denominada EDIL-3 (do inglês, *Epidermal growth factor-like repeats and discoidin I-like domains 3*), é uma proteína expressa em células endoteliais durante o desenvolvimento vascular embrionário (HIDAI *et al.*, 1998), onde atua promovendo a adesão celular através da interação com receptores de integrina $\alpha\beta 3$ (SCHÜRPF *et al.*, 2012). Em condições normais nos tecidos adultos, não há expressão de Del-1, enquanto que, em condições cancerosas, sua expressão é retomada e a proteína atua como mediadora do crescimento tumoral por estimular a angiogênese, acelerando o crescimento do tumor sólido pela diminuição da apoptose (AOKA *et al.*, 2002). Tais fatos contribuem para sua potencialidade como biomarcador tumoral, permitindo diagnóstico com alta sensibilidade. Entretanto, além do CM, sabe-se que essa proteína também é expressa em outros tipos de tumores, como carcinoma pulmonar (LEE *et al.*, 2015).

1.2 Vesículas extracelulares pequenas (SEVs)

Vesículas extracelulares (EVs) são vesículas membranosas produzidas e secretadas por diferentes tipos celulares, em condições saudáveis ou patológicas (SIMPSON *et al.*, 2009), como reticulócitos, células epiteliais intestinais, células hematopoiéticas e tumores (RAPOSO *et al.*, 1996; CHAPUT *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2015), sendo comumente encontradas em fluidos corporais, como sangue (LI *et al.*, 2008), saliva (GONZALEZ-BEGNE *et al.*, 2009) e urina (KELLER *et al.*, 2007). As EVs podem ser classificadas em três grandes classes de acordo com sua biogênese: ectossomos ou microvesículas de desprendimento, corpos apoptóticos e exossomos. Os ectossomos

apresentam 100-1000 nm de diâmetro e são liberados das células por protrusão externa ou brotamento; os corpos apoptóticos têm diâmetro de 50-5000 nm e são liberados por células em processo de apoptose. No caso dos exossomos, também denominados de vesículas extracelulares pequenas (SEVs), seu tamanho varia entre 50-100 nm. Eles são formados por brotamento interno das membranas de endossomos, resultando em vesículas intraluminais (ILVs) dentro de corpos multivesiculares (MVBs), os quais podem tomar dois caminhos. Os MVBs degradativos são os que se dirigem aos lisossomos para serem degradados, enquanto que os MVBs exocíticos se fundem à membrana plasmática e têm seu conteúdo – as ILVs – liberados para o microambiente extracelular. Dessa forma, as ILVs liberadas para a região extracelular são denominadas vesículas extracelulares pequenas (KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016).

Estruturalmente, consistem em uma membrana de bicamada lipídica similar a membrana celular e transportam componentes provenientes da célula hospedeira, como proteínas, material genético, metabólitos e lipídeos, refletindo seu estado fenotípico (VALADI *et al.*, 2007; KOWAL, TKACH, THÉRY, 2014). As SEVs desempenham importante função na comunicação intercelular e participam da regulação tanto de processos fisiológicos quanto de processos patológicos, como o câncer; além disso, estão envolvidas nos processos de progressão e metástase (ZHANG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017). Por esse motivo, células tumorais liberam 10 vezes mais SEVs do que células saudáveis, sendo que a cada mililitro de sangue encontra-se mais de 10^9 partículas dessas vesículas em condições de tumor. Uma vez que as SEVs são passíveis de serem detectadas em fluídos corporais e que apresentam material genético e/ou biomoléculas, como proteínas e lipídeos, as quais servem como biomarcadores do tipo de tumor, estas tornam-se potenciais alvos para diagnóstico da doença (LI *et al.*, 2017).

1.3 Biossensores

Os biossensores surgiram em 1962 com Leland C. Clark, bioquímico americano que, pela imobilização da glicose oxidase em uma membrana, desenvolveu o primeiro biossensor enzimático capaz de detectar e quantificar os níveis de glicose em determinada amostra (PALCHETTI; MASCINI, 2010). Desde então, os biossensores têm sido amplamente utilizados em diversas áreas, dentre elas a alimentícia (VAN DORST *et al.*, 2010) e médica para diagnóstico de doenças, como dengue (ANUSHA *et al.*, 2019),

zika (DA FONSECA ALVES *et al.*, 2019), Alzheimer (KAUSHIK *et al.*, 2016) e câncer (PRASAD *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2020). Os sensores biológicos são dispositivos analíticos de detecção molecular compostos por uma biocamada acoplada a um transdutor. Na biocamada estão presentes moléculas biológicas capazes de se ligar especificamente ao analito, como enzimas, anticorpos e ácidos nucleicos. Quando em contato com o alvo, o biorreconhecimento entre as moléculas gera uma variação físico-química, a qual é detectada pelo transdutor e convertida em um resultado mensurável (ODENTHAL; GOODING, 2007).

Quando o biossensor baseia-se no evento de ligação entre antígeno e anticorpo, o mesmo denomina-se imunossensor, dispositivo que explora a especificidade inerente da imunorreação devido a formação de um complexo estável entre as moléculas envolvidas (LIN; JU, 2005). Esses dispositivos demonstraram alto potencial para o monitoramento de marcadores proteicos relacionados com o câncer (WANG, 2006). O primeiro imunossensor eletroquímico para detecção de um marcador de câncer, a gonadotrofina coriônica humana (hCG), foi elaborado no final dos anos 70 (AIZAWA *et al.*, 1979) e, a partir disso, diversos outros dispositivos baseados na mesma tecnologia foram desenvolvidos (ZHANG *et al.*, 2011; CHOUDHARY *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2018; PRASAD *et al.*, 2020). A confiabilidade de um imunossensor está intrinsecamente relacionada com a orientação e disponibilidade dos anticorpos para que o processo de interação antígeno-anticorpo na superfície da sonda ocorra adequadamente. Dessa forma, faz-se uso de uma monocamada automontada (do inglês, *self assembled monolayer* – SAM) de compostos organossulfurados em ouro, cuja finalidade é garantir a disposição ordenada, homogeneidade, simplicidade e versatilidade para a imobilização das biomoléculas (SOLANKI *et al.*, 2010; CHAUHAN *et al.*, 2016).

Os anticorpos, moléculas base para os imunossensores, são glicoproteínas e suas unidades apresentam formato de “Y”, onde a parte superior contém uma extremidade amina livre e é denominada região Fab, responsável pela ligação com o antígeno, e a parte inferior expõe uma extremidade carboxílica livre, nomeada região Fc, pela qual essa biomolécula liga-se à membrana celular. A imobilização dos anticorpos na biocamada se dá através das extremidades livres e pode ocorrer de forma não covalente ou covalente.

A imobilização não covalente pode acontecer por intermédio de proteínas intermediárias, como a proteína A e proteína G, as quais apresentam domínios de ligação específicos para a porção Fc dos anticorpos. Dessa forma, as biomoléculas se dispõem de maneira orientada na superfície da biocamada, garantindo melhor desempenho do dispositivo. Em contrapartida, as interações que mantem o anticorpo na superfície geralmente são fracas e sensíveis a mudanças no pH, temperatura e salinidade, por exemplo, instabilidade que culmina em baixo desempenho analítico (TRILLING; BEEKWILDER; ZUILHOF, 2013). É possível driblar a questão da instabilidade imobilizando os anticorpos em superfícies de ouro por meio de grupos tiol. Uma maneira de fazer isso é pela emissão de luz ultravioleta, capaz de quebrar as pontes dissulfeto, produzindo grupos tiol reativos. Apesar da estabilidade promovida por essa abordagem, a absorção da luz por ligações dissulfeto internas às moléculas pode deixá-las inativas e comprometer a interação com o analito (DELLA VENTURA *et al.*, 2011).

Por outro lado, a imobilização covalente garante a estabilidade das moléculas e sensibilidade do sistema, de forma orientada ou aleatória. Uma maneira usual de conduzir essa estratégia é pela ativação dos grupos carboxílicos disponíveis por meio de uma reação com carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS), gerando uma molécula intermediária parcialmente estável (éster NHS). A presença de uma amina primária gera um grupo amida pela conjugação com o ácido carboxílico ativado. Assim, quando adicionada diretamente aos anticorpos, a solução EDC/NHS ativa os grupos carboxílicos presentes na região Fc, imobilizando-os de forma orientada. Em substrato de ouro, moléculas como a cisteamina são as mais indicadas para esse processo por apresentarem um grupo tiol, capaz de se ligar ao ouro, e uma extremidade amina livre, que reagirá com o grupo carboxílico da região Fc. Todavia, apesar de resultar em uma ligação estável, é possível a formação de redes entre os anticorpos durante a reação de ativação devido a interação entre os grupos carboxílicos de um anticorpo com os grupos amina dos outros ao seu redor, dificultando a disponibilidade dos sítios de ligação para reconhecimento do antígeno (TRILLING; BEEKWILDER; ZUILHOF, 2013; LI; CHEN, 2018).

Outra estratégia usando a solução EDC/NHS é adicioná-la às moléculas da SAM, promovendo a imobilização não orientada. Isso é possível quando se tem moléculas

como o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), o qual possui uma extremidade tiol livre, assim como a cisteamina, pela qual é possível ligar-se ao ouro, e tem na extremidade oposta um grupamento carboxílico, o qual será ativado pela reação de substituição promovida pela combinação EDC/NHS. Dessa forma, os anticorpos ligam-se pela região Fab (amina) de forma não orientada (BRAIEK *et al.*, 2012; GOGOLA *et al.*, 2019). Outra maneira de promover essa orientação é pela combinação de cisteamina e glutaraldeído. O glutaraldeído é uma molécula que dispõe de duas extremidades carbonilas livres e atua como ponte entre as aminas da cisteamina e dos anticorpos, garantindo sua imobilização pela região Fab (HOU *et al.*, 2016). Essa metodologia supera a problemática da formação de redes pela imobilização orientada, mas pode dificultar o acesso da proteína ao sítio de ligação do anticorpo e diminuir a capacidade de ligação ao antígeno (LI; CHEN, 2018).

1.3.1 Biossensores para SEVs

Diversos biossensores para detecção de SEVs foram desenvolvidos, utilizando desde microRNAs (PANG *et al.*, 2019) até proteínas de membrana (TSANG *et al.*, 2019) para diferentes finalidades, como identificação de rejeição de transplante de rim (PARK *et al.*, 2017), diagnóstico precoce da doença de Alzheimer (CHAE *et al.*, 2017), diagnóstico de câncer pancreático (PANG *et al.*, 2019) e diferenciação de vesículas parasitárias e do hospedeiro (WANG *et al.*, 2018). Para isso, faz-se uso de moléculas já descritas como marcadores dessas vesículas, como CD47, CD63 e CD81 (TONG *et al.*, 2016; TSANG *et al.*, 2019; GOETZL *et al.*, 2020). A Tabela 1 mostra alguns biossensores para detecção de SEVs.

Boriachek e colaboradores desenvolveram uma metodologia eletroquímica simples para detecção de miRNA-21 derivado de vesículas de câncer em amostras de pacientes com adenocarcinoma colorretal. Inicialmente, o miRNA alvo foi isolado por hibridização a sondas complementares biotiniladas imobilizadas em esferas magnéticas revestidas com estreptavidina. As biomoléculas foram liberadas por calor e adsorvidas diretamente em um eletrodo de ouro; sua concentração foi monitorada por meio de voltametria de pulso diferencial na presença de um par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. O limite de detecção obtido foi de 1,0 pmol/L e o desvio padrão relativo foi <5,5%, mostrando uma alta eficiência de

detecção e potencial para auxiliar na prática clínica em pacientes com câncer (BORIACHEK *et al.*, 2018).

Yadav e colaboradores descreveram uma metodologia para quantificar SEVs provenientes de células de mama cancerosas em meio de cultura. Eletrodos impressos foram funcionalizados com anticorpos anti-CD9 biotinizados para capturar a população geral de SEVs, os anticorpos foram imobilizados de forma não covalente por meio da interação estreptavidina-biotina. Em seguida, anticorpos anti-HER2 foram adicionados ao sistema, permitindo a quantificação de SEVs de câncer de mama HER2 positivos. O método demonstrou limite de detecção de $4,7 \times 10^5$ partículas/mL e desvio padrão relativo <4,9%, revelando um sistema barato, simples e sensível para análise em tempo real de SEVs (YADAV *et al.*, 2017).

Método	Sonda	Alvo	Amostra	Condição	Limite de detecção	Tempo de detecção	Referência
Eletroquímico	miRNA	miRNA-21	Soro humano de pacientes com adenocarcinoma colorretal	Adenocarcinoma colorretal	1 pmol/L	~20 min	BORIACHEK <i>et al.</i> , 2018
Eletroquímico	Anticorpo	HER2, CD9	Sobrenadante de cultivo celular de BT-474	Câncer de mama	4,7 x 10 ⁵ partículas/mL	~60 min	YADAV <i>et al.</i> , 2017
Imunoensaio por lateral flow	Anticorpo	CD9, CD63, CD81	Sobrenadante de cultivo celular, plasma humano e urina	Melanoma	8,54 x 10 ⁸ partículas/mL	~15 min	OLIVEIRA-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2016
Transferência ressonante de energia por luminescência (LRET)	Aptâmero	CD63	Sobrenadante de cultivo celular de HepG2	Câncer de fígado	1,1x 10 ⁶ partículas/mL	~30 min	CHEN <i>et al.</i> , 2018
Microfluídica	Anticorpo	IGF-1R	Plasma humano	Câncer de pulmão	0.281 pg/mL	~100 min	HE <i>et al.</i> , 2014
Nanoplasmônico	Anticorpo	CD24, EpCAM	Sobrenadante de cultivo celular de diferentes linhagens e fluido ascítico humano	Saudável, cirrose e carcinoma ovariano	3 x 10 ⁶ partículas/mL	~60 min	IM <i>et al.</i> , 2014
Capacitância elétrica	Aptâmero	CD63	Soro humano	Não informado	2,19 x 10 ³ partículas/mL	Não informado	LEE <i>et al.</i> , 2022
Eletroquímico	Anticorpo	CD81	Sobrenadante de cultivo celular de HEK293	Saudável	1,9 x 10 ⁵ partículas/mL	~30 min	LI; TOFARIS; DAVIS, 2017
Eletroquímico	Aptâmero	CD63	Sobrenadante de cultivo celular de MCF7 e soro humano	Saudável e câncer de mama	9,4 x 10 ⁴ partículas/mL	~60 min	AN <i>et al.</i> , 2019
Eletrohidrodinâmica de corrente alternada ajustável (ac-EHD)	Anticorpo	CD9, HER2, PSA	Sobrenadante de cultivo celular de BT-474, MDA-MB-231 e PC3	Câncer de mama e de próstata	2,7 x 10 ⁶ partículas/mL	~5 min	VAIDYANATHAN <i>et al.</i> , 2014

Tabela 1 – Comparação de diferentes metodologias para a detecção de SEVs.

1.3.2 Medidas eletroquímicas

Para avaliar o biorreconhecimento, alterações nos parâmetros físicos como corrente, potencial (CAMPANELLA *et al.*, 1999), capacitância (HU *et al.*, 2002), condutância (HIANIK *et al.*, 1999) e/ou impedância (ALFONTA *et al.*, 2001) causadas no sistema pelas imunorreações podem ser monitorados através de técnicas analíticas (LIN; JU, 2005). Nesse sentido, a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica são as técnicas que mais se destacam. A técnica de voltametria cíclica (CV, do inglês, *cyclic voltammetry*) consiste em uma varredura linear do potencial elétrico, de tal forma que ao alcançar um determinado potencial, seu sentido é invertido e o potencial é variado até atingir seu valor inicial, completando um ciclo. Essa técnica é uma das mais empregadas para análises eletroquímicas, uma vez que através dela é possível extrair informações sobre o potencial redox das espécies eletroativas, como o par ferricianeto de potássio/ferricianeto de potássio, e a corrente gerada por essas reações. Esses parâmetros são dependentes dos eventos que ocorrem na camada de biorreconhecimento e, por isso, podem ser usados para quantificar as moléculas alvo (GRIESHABER *et al.*, 2008).

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*) é um método bastante sensível a alterações provenientes das interações biomoleculares na interface eletrodo-solução. A fim de mensurar essas alterações, são aplicadas ao sistema eletroquímico ondas senoidais de baixa amplitude que têm sua frequência variada, de tal forma que os valores da impedância resultante, com seus componentes real e imaginário, sejam coletados. Tais medidas podem ser representadas pelo diagrama de Nyquist, do qual se obtém parâmetros como a capacitância da dupla camada (Cdl), a resistência à transferência de carga (Rct), a resistência da solução (R Ω) e a impedância de Warburg (Zw), que compõem o sistema estudado. Em biossensores, o Rct é o parâmetro mais utilizado para o monitoramento das interações na camada de biorreconhecimento, uma vez que tanto o impedimento estérico das biomoléculas imobilizadas na superfície quanto sua carga elétrica alteram de maneira significativa a transferência de carga do eletrólito para o eletrodo. Assim, é possível detectar a ligação das moléculas alvo à biomolécula imobilizada na superfície do eletrodo (ERTUĞRUL; UYGUN, 2013).

Dessa forma, as etapas envolvidas nesse sistema podem ser basicamente resumidas em reconhecimento do analito, transdução do sinal e leitura. O transdutor é responsável por converter o evento de reconhecimento em um sinal elétrico, sendo o tipo amperométrico mais atrativo para análises por apresentar alta sensibilidade e ampla faixa linear, já que seu funcionamento se baseia na aplicação de um potencial constante e monitoramento da corrente, associada com redução ou oxidação de uma espécie eletroativa envolvida no processo de reconhecimento, sendo que, para isso, uma solução eletrolítica é requerida (WANG, 2006). Os biossensores eletroquímicos apresentam vantagens em relação às técnicas analíticas tradicionais, como rapidez na obtenção dos resultados, baixo-custo e possibilidade de miniaturização, permitindo a portabilidade e utilização *point-of-care*, sem que seja necessária complexa instrumentação e infraestrutura laboratorial (WANG, 2006; ODENTHAL; GOODING, 2007; CHAUHAN *et al.*, 2016; FELIX; ANGNES, 2018; WANG *et al.*, 2019).

1.4 Nanomateriais

Nanomateriais apresentam características físicas únicas devido a sua alta razão área/volume (ROSI; MIRKIN, 2005), fazendo com que estes sejam amplamente empregados na área médica na forma de imunomoduladores (MOYANO *et al.*, 2016), transportadores para entrega direcionada de medicamentos (FAROKHZAD, 2008) e biossensores (EL-ANSARY; FADDAH, 2010) como ferramenta de diagnóstico para diferentes doenças, como Alzheimer (PARK *et al.*, 2019), Ebola (DUAN *et al.*, 2015) e câncer (WINTER *et al.*, 2003). Quando acoplados a um biossensor, o papel dos nanomateriais pode ser de aumentar a área superficial dos eletrodos, amplificar o sinal ou atuar como marcadores colorimétricos (CHAMORRO-GARCIA; MERKOÇI, 2016; SU *et al.*, 2017). Nesse sentido, as nanopartículas de ouro (AuNps) são um dos nanomateriais mais empregados para diagnóstico (SCHNEIDER *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2020; PRASAD *et al.*, 2020) e podem ser conjugadas a diferentes compostos, como quitosana (DOS SANTOS *et al.*, 2004), anticorpos (ZHANG *et al.*, 2002) ou DNA (ALIVISATOS *et al.*, 1996). Sua versatilidade é justificada por estas apresentarem aspectos diferenciais como estabilidade química, sendo a mais estável dentre as nanopartículas de metal, síntese simples e biocompatibilidade (DANIEL; ASTRUC, 2004; KUMAR *et al.*, 2011). Tanto as nanopartículas de ouro quanto outras nanopartículas metálicas apresentam um efeito

particular de ressonância plasmônica de superfície (do inglês, surface plasmon resonance - SPR), não presente em outras nanoestruturas. Ocorre uma oscilação coletiva dos elétrons livres do metal quando em ressonância com um campo eletromagnético, de forma com que as cargas superficiais das partículas sejam separadas e um dipolo seja gerado, o qual oscila na direção do campo elétrico da luz em máxima amplitude e frequência específica (HUANG; EL-SAYED, 2010). Uma banda plasmônica é gerada, a qual pode se deslocar para o vermelho conforme o tamanho do nanomaterial aumente, de forma com que não ultrapasse valores maiores que 700 nm (YANG *et al.*, 2015). Tal evento traz versatilidade para esse nanomaterial, uma vez que suas propriedades ópticas podem ser modificadas por meio do tamanho, formato e composição do elemento utilizado (XU *et al.*, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um biossensor eletroquímico capaz de detectar o biomarcador Del-1 presente em SEVs provenientes de células tumorais e avaliar sua especificidade para câncer de mama. Para isso, será utilizada a estratégia sanduíche, em que eletrodos de ouro serão modificados com anticorpos anti-CD63 para capturar a população geral de SEVs presentes na amostra. Em seguida, nanopartículas de ouro funcionalizadas com anticorpos anti-Del-1 serão adicionadas ao sistema para marcarem as que forem provenientes de células de mama tumorais, como ilustrado na Figura 1. Uma vez que as nanopartículas de ouro são materiais condutores, espera-se que na presença das SEVs tumorais ocorra um aumento na corrente elétrica e uma diminuição na resistência à transferência de cargas, proporcionais à quantidade de Del-1 presente neles.

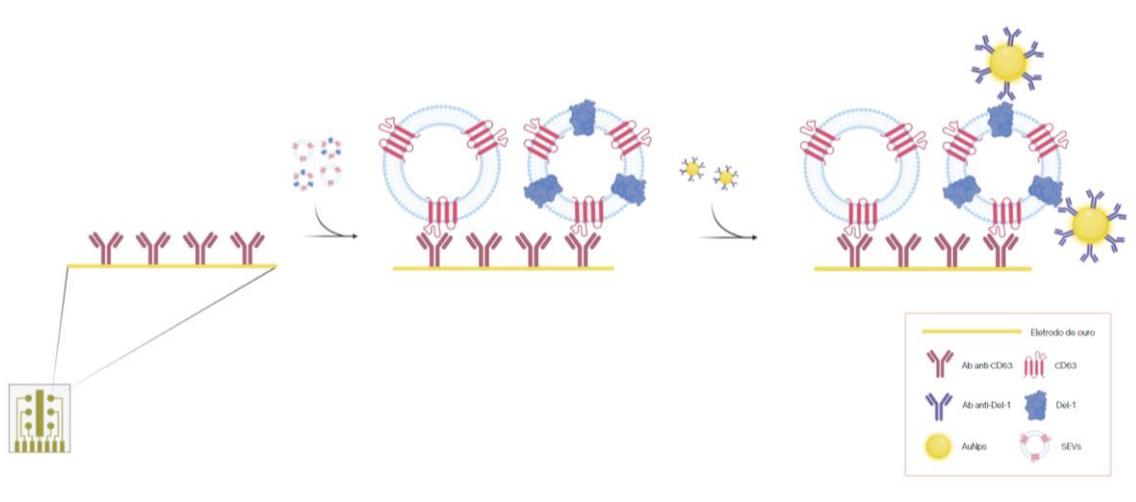


Figura 1 – Esquema do sistema de detecção. A população geral de SEVs capturada a partir do CD63 e as vesículas Del1 positivas identificadas pelas nanopartículas funcionalizadas com o respectivo anticorpo.

Fonte: Elaborado pela autora.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar as linhagens celulares MCF7 e A549 e extrair suas SEVs por ultracentrifugação;
- Caracterizar as SEVs extraídas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA);
- Sintetizar nanopartículas de ouro pelo método de redução por citrato;
- Caracterizar os nanomateriais por técnicas físico-químicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), potencial Zeta e espectroscopia no UV-Vis;
- Funcionalizar as AuNPs com MPA, EDC-NHS e anticorpos anti-Del-1;
- Limpar e funcionalizar eletrodos de ouro multiplex com anticorpos anti-CD63;
- Caracterizar os eletrodos, antes e após funcionalização, por técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS);
- Avaliar a especificidade do sistema de detecção de Del-1 para o diagnóstico de câncer de mama, comparando os resultados com os obtidos para linhagens celulares de câncer de pulmão;

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 Materiais

Os materiais utilizados serão meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), soro fetal bovino, membrana de nylon 0,22 μm , HAuCl_4 (ácido tetracloroáurico), $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (citrato de sódio dihidratado), tampão fosfato-salino (do inglês, *phosphate buffered saline* – PBS) (10 mM, 0,15 M NaCl, pH 7,4, com e sem inibidor de protease), ácido 3-mercaptopropiônico (do inglês, *3-mercaptopropionic acid* – MPA), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) e anticorpos anti-Del-1 e anti-CD63. As soluções, quando em meio aquoso, serão preparadas com água ultrapura padrão Milli-Q (18,3 M Ω cm).

3.1.1 Soluções

Tampão fosfato salino (1X PBS, pH 7,4): 10 mmol/L de PO_4^{3-} + 0,1 mol/L de NaCl.

Solução de ácido sulfúrico: 0,5 mol/L em Milli-Q

Solução de BSA: 1% (m/V) em tampão PBS

Solução de Cisteamina: 0,5 mol/L em Milli-Q

Solução de EDC/NHS: 2 mmol/L de EDC + 5 mmol/L de NHS em Milli-Q

Solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$: 5 mmol/L de $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ + 5 mmol/L de $(\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6)$ em 0,1 mol/L de KCl, pH 7,4.

Solução de Glutaraldeído: 2,5% (V/V) em tampão PBS

Solução HAuCl_4 : 0,01% em Milli-Q

Solução de KOH: 2% (m/V) em etanol

Solução de MPA: Solução estoque preparada a 100 mmol/L em etanol e depois diluída para 1 mmol/L em Milli-Q

Solução $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1% (m/V) em Milli-Q

3.2 Metodologia

3.2.1 Cultivo celular

O cultivo celular foi feito para as linhagens MCF7, provenientes de adenocarcinoma de tecido mamário, e A549, originárias de carcinoma pulmonar. As células foram mantidas em garrafas de cultivo celular com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ sob temperatura de 37°C. O crescimento celular foi acompanhado diariamente fazendo-se uso de um microscópio invertido, a viabilidade celular foi checada por coloração de 10 µL do meio de cultivo com 10 µL de azul de tripan, molécula capaz de adentrar pela membrana de células mortas, seguido de análise pelo contador de células automático Countess®. Todas as manipulações foram realizadas em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e incidência de luz ultravioleta.

3.2.2 Extração das SEVs

As SEVs foram extraídas a partir de ultracentrifugação. Ao atingirem confluência de, aproximadamente, 50%, o meio de cultivo foi substituído por DMEM 10% FBS depletado de exossomos. Após 24h, o meio foi retirado e centrifugado por 4 minutos a 1.400 rpm, o sobrenadante foi filtrado em membrana de nylon 0,22 µm e submetido a ultracentrifugação por 2 horas a 100.000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de solução tampão PBS 10 mM. Uma segunda ultracentrifugação foi realizada sob as mesmas condições da primeira, sendo o *pellet* resultante ressuspensionado em PBS contendo inibidor de proteases e armazenados a -80°C. As SEVs extraídas foram submetidas a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês, *Nanoparticle Tracking Analysis*) para aferir seu tamanho e sua concentração.

3.2.3 Eletrodos descartáveis de ouro

3.2.3.1 Fabricação

Os eletrodos de ouro foram desenhados como dispositivos multiplex, permitindo a identificação do analito em quatro amostras diferentes simultaneamente. Seu *design* conta com quatro eletrodos de trabalho, dois eletrodos de referência e um contra-eletrodo, totalizando sete contatos. Ao centro, está localizado o contra-eletrodo, com dois eletrodos de trabalho e um de referência em cada lado (Figura 2C). Sua fabricação

ocorreu pela técnica de fotolitografia com metalização por *sputtering*, tendo como substrato vidro BK7. Essa etapa foi executada pela Dra. Isabella Sampaio nas instalações do CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais).

3.2.3.2 Medidas eletroquímicas

A técnica de voltametria cíclica (CV) foi utilizada para pré-ativação dos eletrodos, enquanto que as etapas de modificação foram monitoradas por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), as quais foram conduzidas no Autolab pelo software NOVA[®]. Para isso, fabricou-se um suporte específico contendo 7 pinos de ouro que fazem contato elétrico com os eletrodos e são conectados ao equipamento pela extremidade oposta. Ainda, fez-se uso de adesivos isolantes para delimitar a área dos eletrodos e garantir que as soluções se mantivessem na superfície do dispositivo (Figura 2). Para realizar as medidas de CV e EIS, utilizou-se como eletrólito uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ 5 mM em 0,1 M de KCl. Foram avaliadas as variações percentuais da resistência da solução (R_s) e da transferência de cargas (R_{CT}).

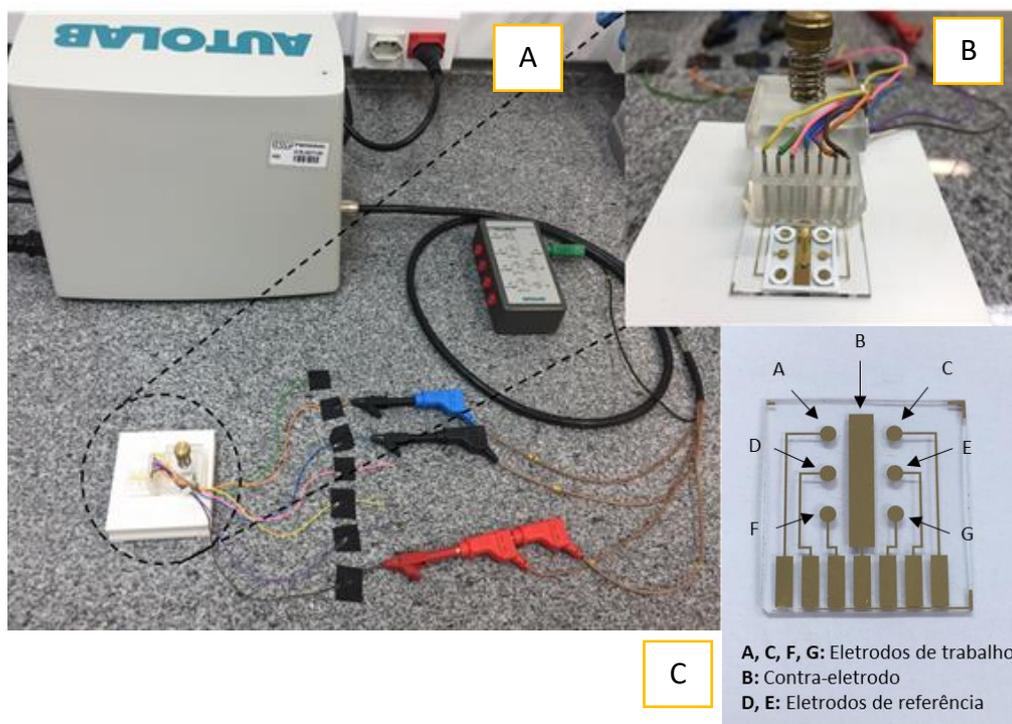


Figura 2 – (A) Aparato para realizar as medidas eletroquímicas no Autolab, com suporte de contato acoplado ao potenciostato. (B) Suporte para o eletrodo, com adesivos para delimitar a área disponível para solução eletrolítica. (C) Eletrodos de ouro multiplex descartáveis contendo 4 eletrodos de trabalho, 1 contra-eletródo e 2 eletrodos de referência.

Fonte: Arquivos do laboratório GNano (IFSC/USP).

3.2.3.4 Construção da SAM

A monocamada automontada na superfície dos eletrodos foi estruturada de diferentes maneiras, fazendo com que os anticorpos ficassem dispostos de forma orientada ou aleatória. Fez-se uso de compostos organossulfurados – cisteamina e MPA – capazes de se ligarem ao ouro via extremidade tiol livre (-SH), mantendo a extremidade oposta disponível para reação com demais componentes da SAM. Para todas as estratégias foi necessária uma etapa de bloqueio com BSA, a fim de evitar um resultado falso-positivo pela interação inespecífica da proteína alvo. Todas as etapas de construção foram monitoradas por EIS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração das SEVs

As SEVs extraídas das linhagens A549 e MCF7 foram quantificadas por NTA, sendo diluídas 100 vezes em PBS 10 mmol/L para tal. O diâmetro das partículas apresentou moda de 118,7 nm e concentração de $7,4 \times 10^7$ partículas/mL para a linhagem A549, e moda de 127,8 nm e concentração de 1×10^{10} partículas/mL para MCF7 (Figura 3).

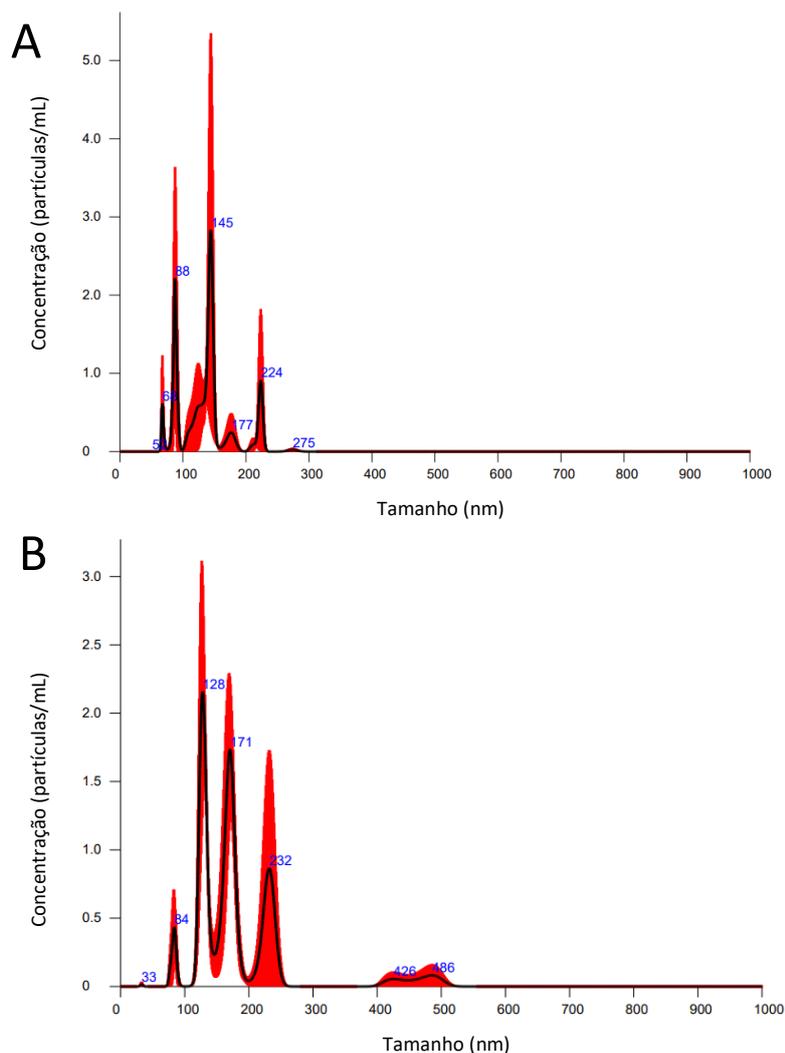


Figura 3 – (A) Gráfico da concentração (partículas/mL) pelo tamanho (nm) das SEVs extraídas das linhagens A549 e (B) MCF7, com o tamanho médio indicado em cada pico e, em vermelho, a faixa de erro.

4.2 Eletrodos descartáveis de ouro

4.2.1 Limpeza

A limpeza dos eletrodos foi o primeiro parâmetro a ser analisado, comparando-se duas estratégias: limpeza ácida e alcoólica. A limpeza ácida foi feita com H_2SO_4 0,5 mol/L, visando a oxidação da camada superficial do ouro. Cada eletrodo de trabalho foi submetido a 5 ciclos de voltametria cíclica a 100 mV s^{-1} na faixa de potencial de -0,3 a 1 V, processo que foi repetido por 3 vezes consecutivas com troca da solução entre elas (Figura 4). A limpeza alcoólica foi feita com lavagens subsequentes de 5 s cada com álcool isopropílico (PA), álcool etílico (PA) e água Milli-Q. Em seguida, os eletrodos foram

modificados com anticorpos CD63 imobilizados de forma não orientada com cisteamina-glutaraldeído. As etapas de construção da SAM consistiram em incubação com cisteamina 10 mmol/L por 15 h, glutaraldeído 2,5% por 1 h, anticorpos CD63 100 µg/mL por 3 h e bloqueio com BSA 1% por 30 min. A detecção aconteceu com SEVs a 10^8 partículas/mL por 1 h (Figura 5).

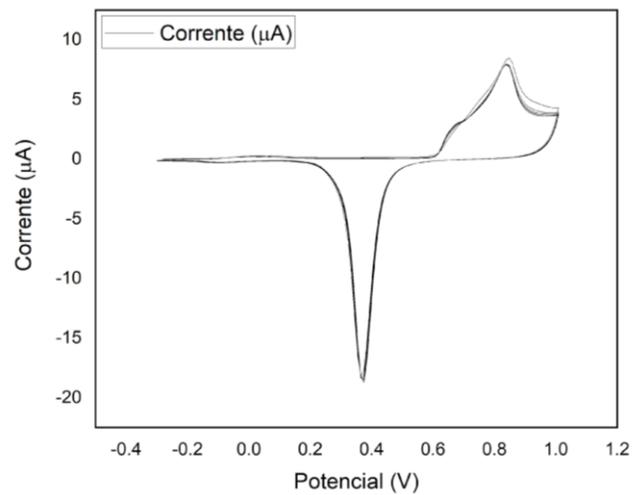


Figura 4 – Voltamograma indicando 5 ciclos de medidas de CV para limpeza do eletrodo de ouro com ácido sulfúrico, sendo possível observar os 3 picos de oxidação do ouro.

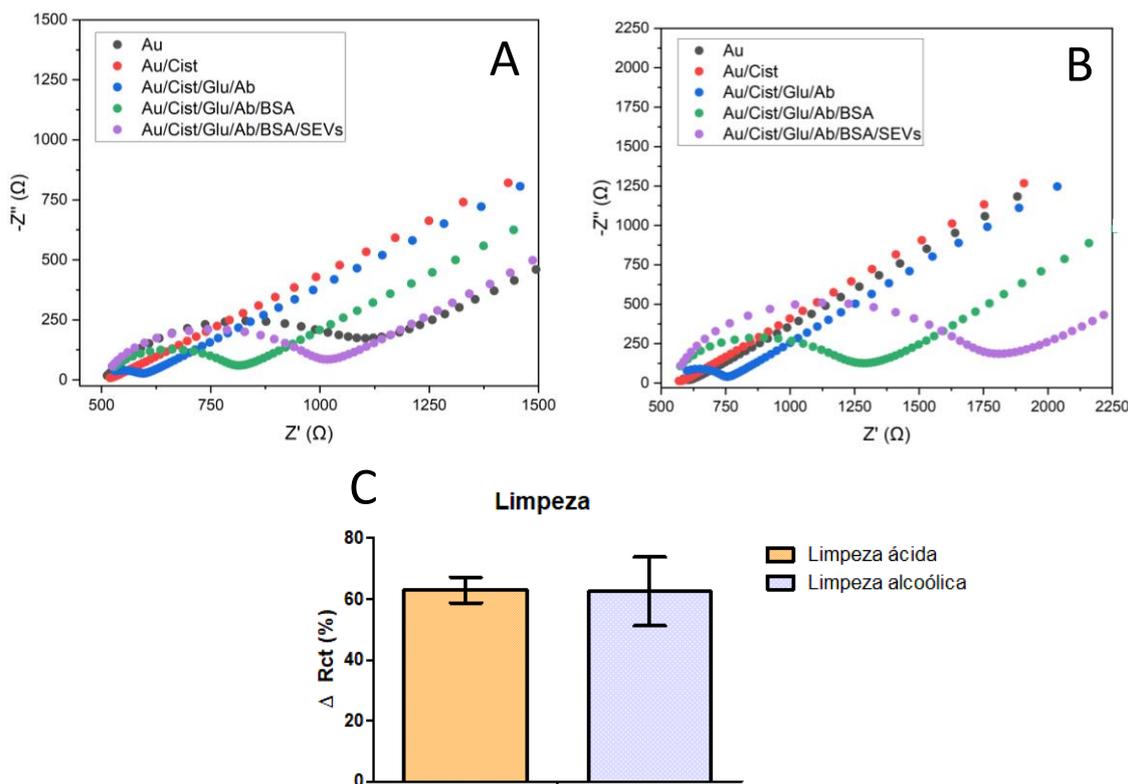


Figura 5 – (A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo limpo com ácido sulfúrico e (B) com limpeza alcoólica após as etapas de funcionalização com cisteamina (Cist), glutaraldeído (Glu), anticorpos anti-CD63 (Ab), BSA e detecção de SEVs a 10^8 partículas/mL. (C) Gráfico de barras representando a variação percentual do R_{CT} após a incubação com as SEVs para eletrodos submetidos a limpezas ácida (em laranja) e alcoólica (em lilás), com desvio padrão entre as réplicas ($n=4$) indicado.

Para ambas limpezas houve um aumento significativo no R_{ct} após a incubação com as SEVs, indicando que o biossensor foi capaz de detectá-las. Ainda, calculou-se a variação percentual do R_{ct} (ΔR_{ct}) a partir da equação $\Delta R_{ct} = \left[\frac{(R_{ct_{final}} - R_{ct_{inicial}})}{R_{ct_{inicial}}} \right] \times 100$, sendo $R_{ct_{inicial}}$ o valor obtido antes da incubação com as SEVs e $R_{ct_{final}}$ após incubação. Foram analisadas 4 réplicas, para a limpeza ácida obteve-se $\Delta R_{ct_{médio}} = 63\%$ e, para a alcoólica, $\Delta R_{ct_{médio}} = 62,5\%$.

Apesar de ambos métodos terem apresentado bons resultados, a limpeza com ácido sulfúrico demonstrou maior reprodutibilidade, observada pelo menor desvio padrão dos valores de ΔR_{ct} (Figura 5C) e, portanto, foi o método escolhido para as próximas etapas.

4.2.2 Detecção de SEVs totais por CD63

Uma vez definida a limpeza mais eficiente, foi analisado qual o melhor método de modificação para organizar a monocamada automontada. Foram analisadas duas

abordagens para imobilização dos anticorpos, uma com o conjunto MPA-EDC-NHS e outra com cisteamina-glutaraldeído. Para a primeira, os eletrodos foram incubados com uma solução aquosa de MPA 1 mmol/L por 15 h, seguido pela adição de EDC/NHS 2 mmol/L / 5 mmol/L por 30 min, anticorpos anti-CD63 100 µg/mL por 3 h, BSA 1% por 30 min e detecção das SEVs 10⁸ partículas/mL por 1 h.

O diagrama de Nyquist obtido a partir da medida de impedância revelou uma diminuição no semicírculo após a incubação com as SEVs, perfil que não era esperado (Figura 6A). Quando imobilizadas no eletrodo, as proteínas promovem maior bloqueio da superfície, culminando no aumento da resistência a transferência de cargas no sistema (BRAIEK *et al.*, 2012). Dessa forma, espera-se observar um aumento no semicírculo após a etapa de detecção.

Para o segundo conjunto, um eletrodo foi incubado por 15 h com solução aquosa de cisteamina 10 mmol/L, glutaraldeído 2,5% por 1 h, anticorpos anti-CD63 100 µg/mL por 3h, BSA 1% por 30 min e SEVs 10⁸ partículas/mL por 1 h. O perfil linear observado após a incubação dos eletrodos com a cisteamina (Figura 6B) indica que a transferência de cargas é favorecida (menor Rct) devido à protonação do grupo amina da cisteamina, uma vez que o pH da solução (~5) era inferior ao pKa da molécula (~10), resultando em atração dos elétrons da solução redox pela molécula carregada positivamente (FIGUEIREDO *et al.*, 2015). Posteriormente, a camada formada pelo glutaraldeído e anticorpo (indicado na Figura 6B por Au/Cist/Glu/Ab) dificulta a transferência de cargas, aumentando o Rct (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020) (Figura 6B). Tal aumento continua sendo observado após incubação com as SEVs, indicando que as mesmas foram capturadas pelos anticorpos imobilizados na superfície do eletrodo.

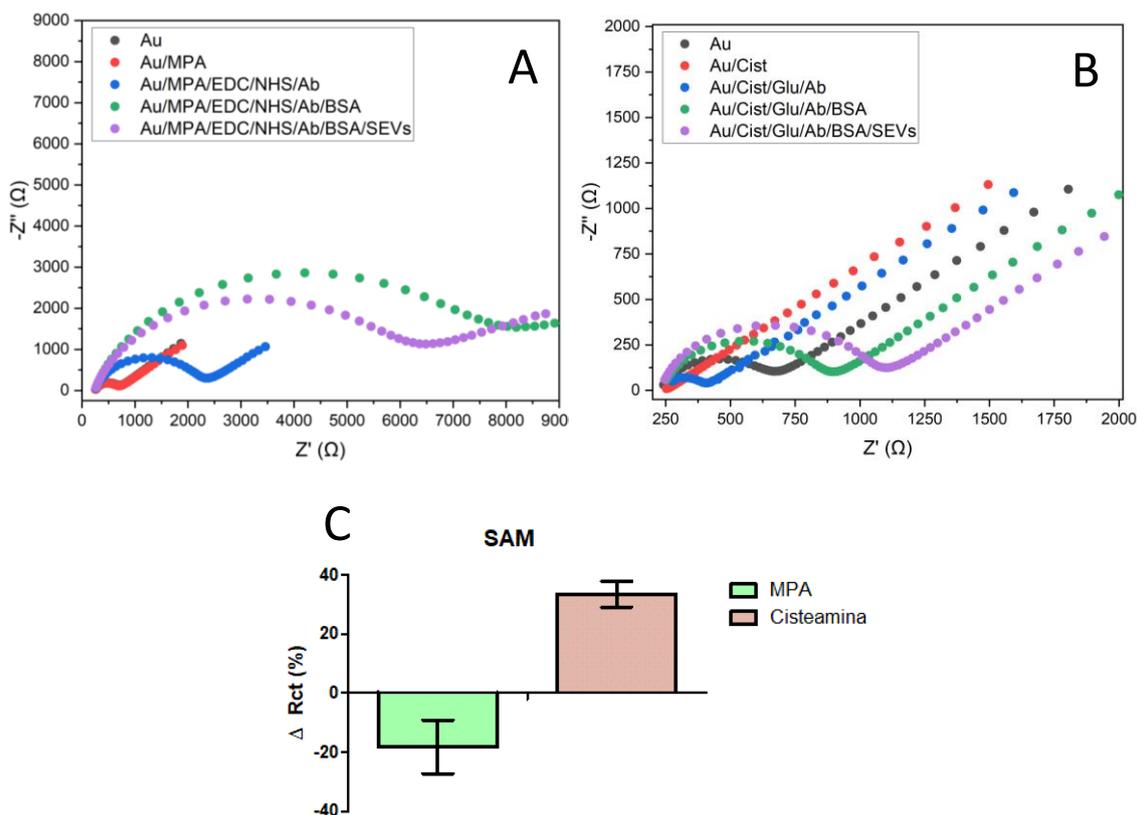


Figura 6 – (A) Diagrama de Nyquist para as etapas de funcionalização e detecção de SEVs a 10^8 partículas/mL em eletrodo modificado com os conjuntos MPA-EDC-NHS e (B) cisteamina-glutaraldeído. (C) Gráfico de barras representando a porcentagem de variação do Rct entre os eletrodos modificados com MPA (em verde) e Cisteamina (em rosa), com desvio padrão entre as réplicas (n=4) indicado.

A média da variação na resistência a transferência de cargas ($\Delta R_{ct, \text{médio}}$) entre os dois sistemas foi de 33,4% para a modificação com cisteamina e -18,3% para a com MPA, sendo 4 réplicas analisadas (Figura 6C). Juntamente com os perfis de impedância, tais resultados apontaram para o método de modificação por cisteamina como mais reprodutivo, devido ao menor desvio padrão observado entre as réplicas. Todavia, durante a análise com diferentes concentrações de SEVs – 10^6 , 10^7 e 10^8 partículas/mL, com 3 réplicas cada –, não foi observada uma variação de sinal proporcional à variação na concentração das SEVs (Figura 7), revelando baixa sensibilidade do sistema.

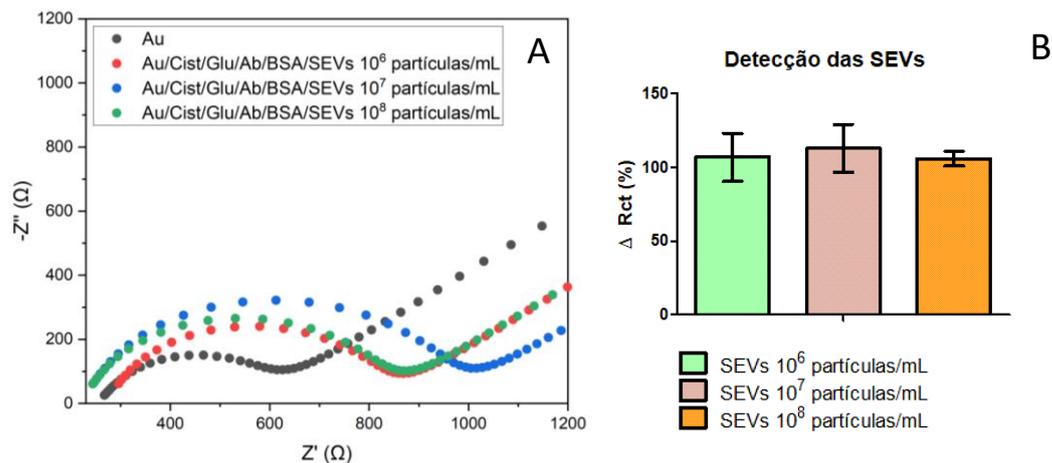


Figura 7 – (A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo modificado e incubado com diferentes concentrações de SEVs. (B) Gráfico de barras representando a porcentagem do ΔR_{ct} na detecção de SEVs em diferentes concentrações, com desvio padrão entre as réplicas (n=3) indicado.

Uma alternativa foi analisar o sistema com outro método de imobilização dos anticorpos. Dessa vez, a extremidade carboxílica dos mesmos foi previamente ativada em uma reação com EDC/NHS, na qual 4 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos anti-CD63 foram incubados com EDC/NHS 8 mmol/L / 5 mmol/L por 2 h a 4°C. A etapa com cisteamina não se alterou e, em seguida, os eletrodos foram incubados por 1 h a 4°C diretamente com a solução de anticorpos pré-ativados. A etapa de bloqueio com BSA também se manteve a mesma. A detecção foi realizada com SEVs nas concentrações de 10^2 , 10^5 e 10^8 partículas/mL por 1 h a 4°C. A Figura 8 revelou que houve uma alteração de sinal proporcional à variação de concentração, o que pode ser explicado pela imobilização orientada dos anticorpos, garantindo maior disponibilidade da região Fab para a interação com o alvo – CD63. Entretanto, esperava-se observar uma variação maior entre as concentrações de 10^2 e 10^8 partículas/mL, por serem estas ordens de grandeza significativamente distantes.

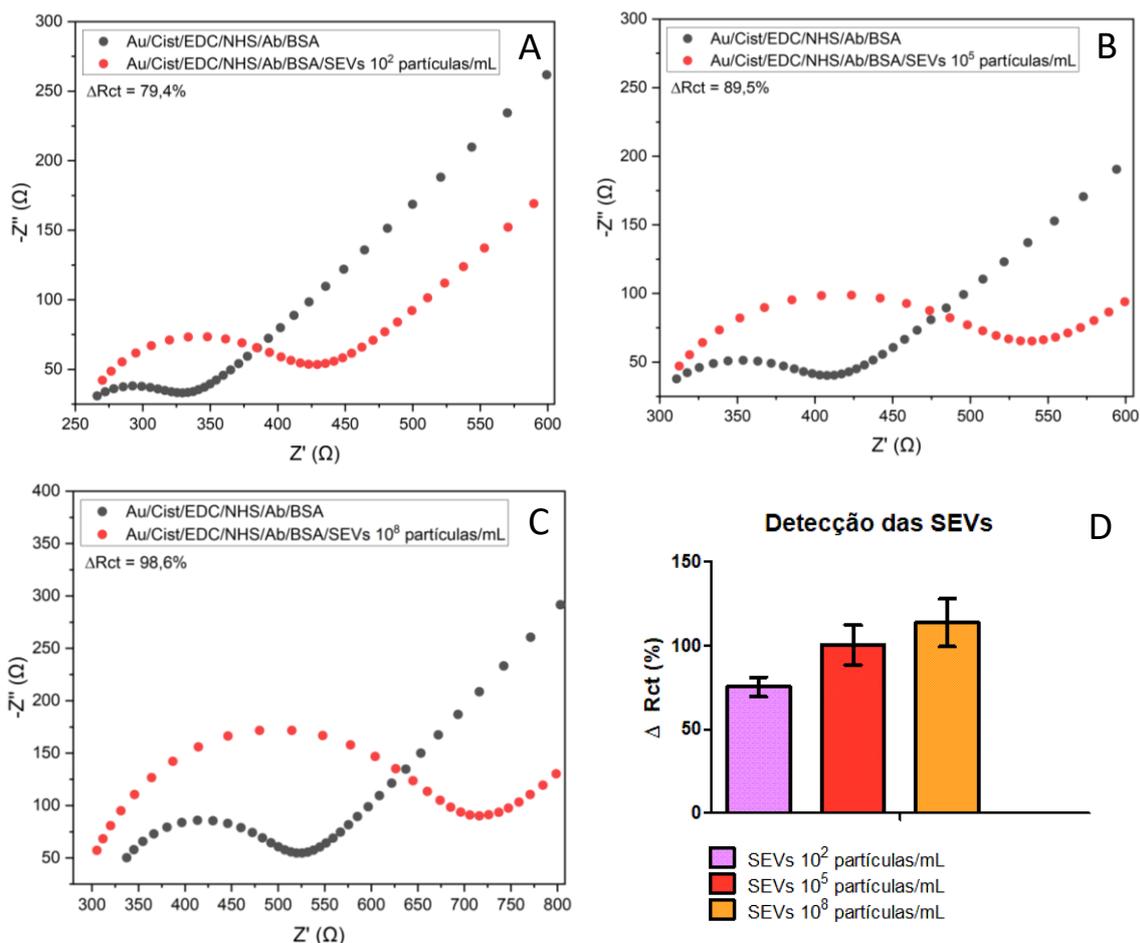


Figura 8 – (A) Diagrama de Nyquist antes e após etapa de detecção com SEVs a 10^2 , (B) 10^5 , (C) e 10^8 partículas/mL. (D) Gráfico de barras representando a porcentagem do ΔR_{ct} na detecção de SEVs em diferentes concentrações, com desvio padrão entre as réplicas (n=3) indicado.

4.2.3 Detecção de SEVs tumorais por Del-1

4.2.3.1 Eletrodos de barra

Apesar de CD63 ser um biomarcador bem estabelecido para SEVs gerais, há indícios de que esse receptor pode estar presente em baixas quantidades nas vesículas extracelulares da linhagem MCF7 (RONGOIANNI *et al.*, 2019), justificando a baixa sensibilidade observada nos testes anteriores. Frente a isso, elaborou-se uma nova estratégia para detecção das SEVs pela identificação direta da proteína Del-1, não mais fazendo uso da metodologia sanduíche mencionada anteriormente. Os novos testes foram conduzidos em eletrodos de barra, considerados modelos para biossensores eletroquímicos. Utilizou-se uma célula eletroquímica composta por um eletrodo de trabalho, um contra-eletrodo de platina (0,5 cm x 1,0 cm) e um eletrodo de referência Ag/AgCl com solução interna de KCl 3 mmol/L, ilustrados na Figura 9.

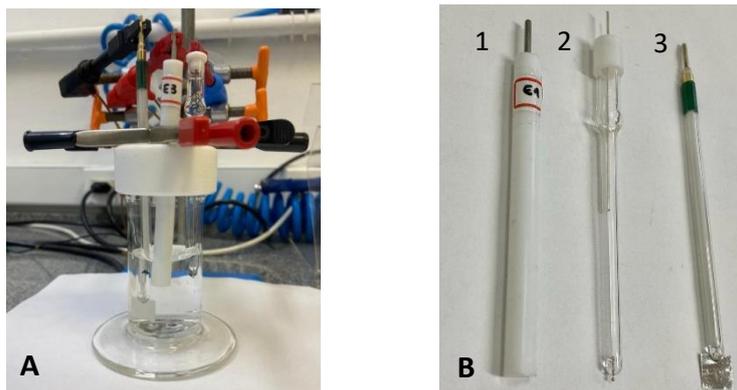


Figura 9 – (A) Célula eletroquímica utilizada para realizar as medidas. (B) Eletrodos utilizados: eletrodo de trabalho (1), eletrodo de referência (2) e contra-eletrodo (3).

Fonte: Elaborado pela autora.

Os eletrodos de barra foram polidos em lixa 2000 por 4 min e, em seguida, imersos em solução piranha por 10 s, 3 vezes consecutivas, com intervalo de 5 s entre as imersões. Feito isso, os eletrodos foram submetidos a voltametria cíclica em solução de H_2SO_4 0,5 mol/L purgada com nitrogênio por 15 min, com 50 ciclos a 300 mV/s seguidos de 20 ciclos a 100 mV/s (Figura 10).

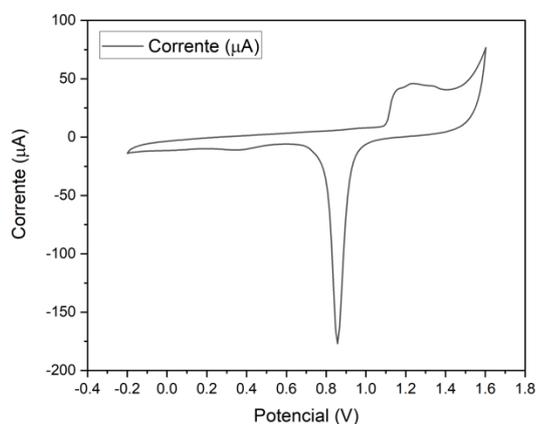


Figura 10 – Voltamograma indicando o último ciclo de CV a 100 mV/s para limpeza do eletrodo de ouro com ácido sulfúrico, sendo possível observar os 3 picos de oxidação do ouro.

Inicialmente, manteve-se a construção da SAM com cisteamina e anticorpos pré-ativados, como descrito anteriormente, com alterações no volume de incubação e na concentração de anticorpos. Para a incubação com cisteamina, foram usados 100 μL de solução e, para as seguintes, 80 μL . Para a pré-ativação com EDC/NHS foram usados anticorpos anti-Del-1 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A etapa de detecção consistiu na incubação dos eletrodos com SEVs 2×10^7 partículas/mL por 1h. Apesar de ter sido observado um

aumento na etapa de detecção (Figuras 11A), os dados não foram reprodutíveis, evidenciado pelo alto desvio padrão (SD) entre as réplicas (SD = 19,80) e desvio padrão relativo (RSD) de 23 % (Figura 11B). Assim, a variação observada pode ser devido a interações inespecíficas na superfície do eletrodo de trabalho.

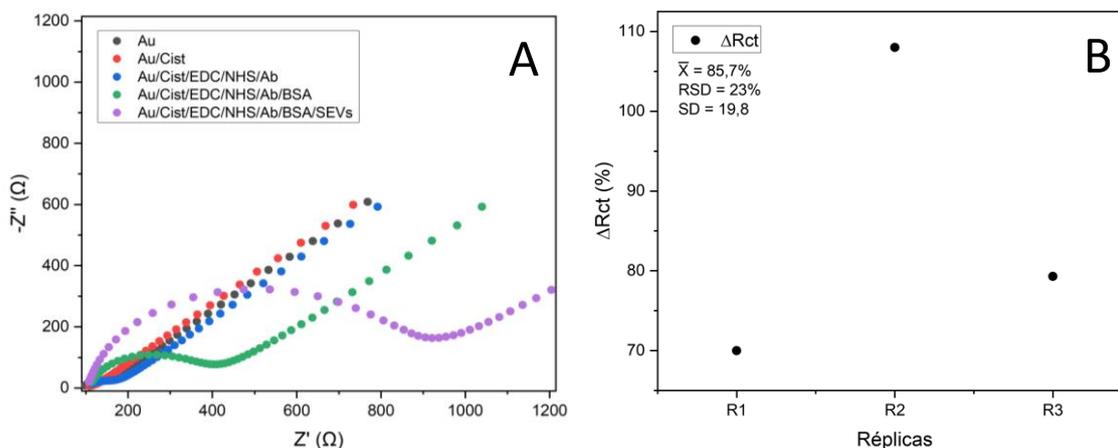


Figura 11 – (A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo de barra modificado para detecção direta das SEVs por Del-1. (B) Dotplot representando a porcentagem do ΔRct em função das réplicas nos eletrodos modificados com cisteamina e incubados com SEVs a 10^7 partículas/mL, com média, desvio padrão e desvio padrão relativo indicados.

Visando a melhora no desempenho do biossensor, foi investigada a influência do tempo de incubação com os anticorpos. Para isso, a etapa de imobilização foi conduzida por 3 h e, ainda, os eletrodos foram incubados com uma solução controle antes da etapa de detecção. O controle consistiu em uma solução de PBS 10 mmol/L com inibidor de protease, solução na qual as SEVs foram armazenadas. Apesar de a imobilização dos anticorpos ter sido mais eficiente para o tempo de incubação maior, os resultados apontam uma maior variação com a amostra controle do que com a amostra de SEVs (Figura 12), reforçando a hipótese de que interações inespecíficas estejam ocorrendo com outros compostos da amostra.

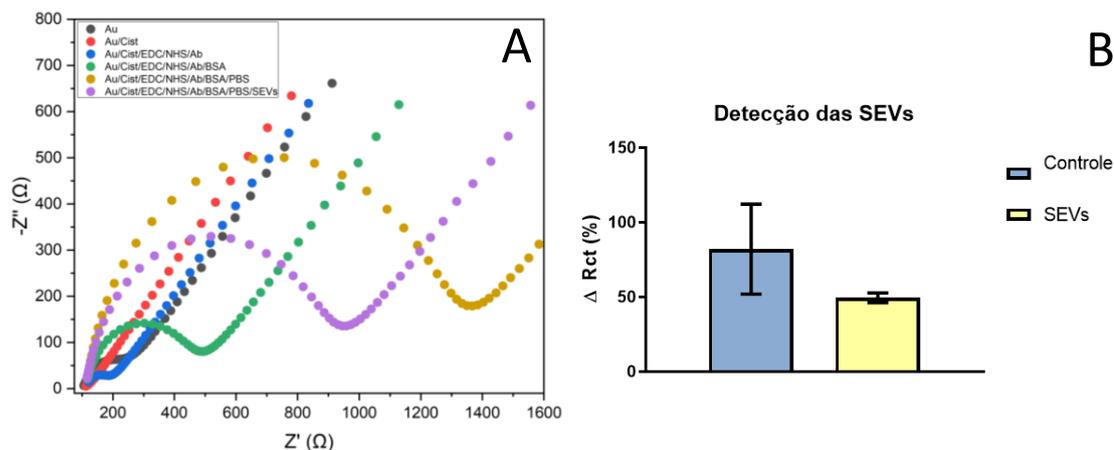


Figura 12 – (A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo de barra com incubação de 3 h com os anticorpos e 1 h com a amostra controle. (B) Gráfico de barras representando a porcentagem do ΔR_{ct} entre a incubação com a amostra controle (em azul) e a amostra real, contendo SEVs a 10^7 partículas/mL (em amarelo), com desvio padrão entre as réplicas ($n=3$) indicado.

Dessa forma, o sistema foi analisado usando um protocolo estabelecido por Cecchetto e colaboradores (CECCHETTO *et al.*, 2015) de imobilização dos anticorpos em que eles não ficam orientados. Os eletrodos foram incubados em 150 μ L de solução alcoólica contendo uma mistura de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) 1 mmol/L e 6-mercaptohexanol (MCH) 1 mmol/L por 15 h, seguidos de 30 min em solução aquosa de EDC/NHS 400 mmol/L / 100 mmol/L, e de 1 h com anticorpos anti-Del-1 a 8 μ g/mL. A etapa de bloqueio foi feita com etanolamina 1 mol/L por 5 min, para inativação do éster remanescente de NHS, e BSA 0,1% por 30 min. Uma vez montada a SAM, os eletrodos foram incubados com a solução controle por 1 h e, em seguida, com as SEVs 2×10^7 partículas/mL por mais 1 h. Houve uma variação maior com a amostra controle do que com a amostra contendo as SEVs, indicando, mais uma vez, interações inespecíficas entre a SAM e a amostra (Figura 13).

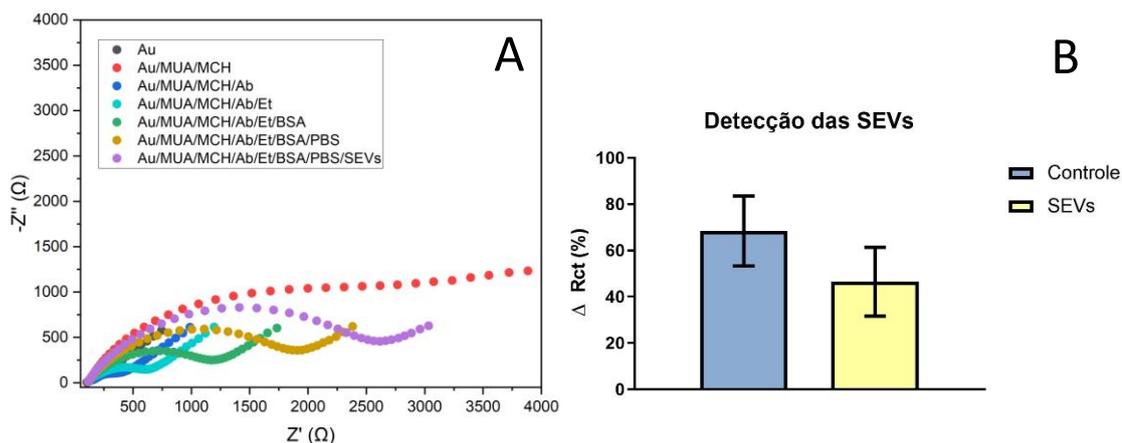


Figura 13 – (A) Diagrama de Nyquist para o eletrodo de barra modificados com MUA. (B) Gráfico de barras representando a porcentagem do ΔR_{ct} entre a amostra controle (em azul) e a amostra real, contendo SEVs a 10^7 partículas/mL (em amarelo), com desvio padrão entre as réplicas ($n=2$) indicado.

4.2.3.1 Eletrodos multiplex

Devido à falta de sensibilidade e especificidade observada nos testes anteriores, o sistema de detecção foi modificado mais uma vez e as análises voltaram a ser conduzidas em eletrodos de ouro multiplex. Um novo protocolo de limpeza foi abordado, o qual consistiu na imersão dos eletrodos em soluções de acetona, água, KOH, etanol e água, procedimento que contribui para uma superfície carregada negativamente, favorecendo a imobilização da cisteamina (RODRÍGUEZ *et al.*, 2021). Ainda, as concentrações de cisteamina e anticorpos foram alteradas para 0,5 mol/L e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. As etapas de imobilização seguiram como descritas anteriormente e a SAM foi construída com cisteamina, anticorpos anti Del-1 pré-ativados com EDC e NHS, e BSA (Figura 14).

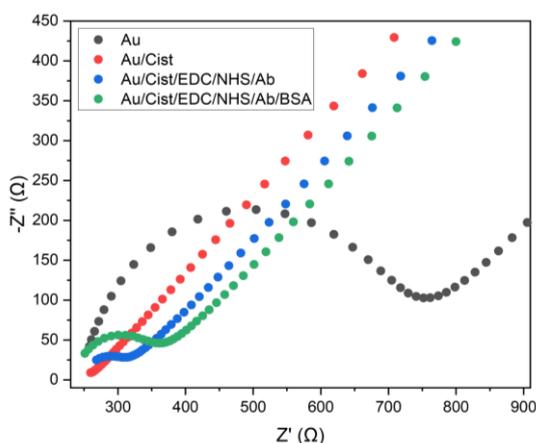


Figura 14 – Diagrama de Nyquist para a construção do biossensor com cisteamina 0,5 M, anticorpos anti Del-1 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pré-ativados com EDC 8 mM e NHS 5 mM, e BSA 1%.

Apesar de a literatura indicar que Del-1 estaria presente na matriz extracelular das SEVs, os dados obtidos levantaram dúvidas acerca dos níveis de expressão e da localização celular deste biomarcador, com a hipótese de localização intracelular, o que justificaria a inespecificidade de detecção até agora. O método mais adequado para confirmar seus níveis de expressão seria *Western Blot*, técnica que consiste em extração das proteínas celulares e separação das mesmas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, seguido de transferência para uma membrana de nitrocelulose e incubação com anticorpos primários, específicos para a proteína de interesse, e secundários, com sonda fluorescente. A revelação da membrana se dá por quimioluminescência pela qual é possível analisar os níveis de expressão da proteína a partir da intensidade da banda (MAHMOOD; YANG, 2012). Já sua localização celular poderia ser analisada por *Immunogold Labeling*, no qual anticorpos primários específicos são usados como sondas de afinidade para antígenos expostos na superfície e nanopartículas de ouro conjugadas com anticorpos secundários ligam-se aos primários, servindo como marcadores de antígeno quando a seção é examinada em um microscópio eletrônico de transmissão (D'AMICO; SKARMOUTSOU, 2008).

Entretanto, como o projeto foi conduzido durante a pandemia, alguns limitantes impediram a realização destas análises. Devido à alta demanda de insumos para COVID-19, os reagentes necessários – como anticorpos secundários com sonda fluorescente – estavam com prazo de entrega muito longo, fora do tempo hábil para término do projeto. Além disso, a técnica de *Western Blot* precisaria ser realizada nas dependências de nosso laboratório parceiro, onde há infraestrutura e equipamentos necessários para a análise, mas o mesmo estava com limitação do número de pessoas também devido a restrições da pandemia.

Uma opção seria lisar as SEVs por métodos convencionais de lise, fazendo uso de tampões com detergente – RIPA, Triton-X – para quebrar a bicamada lipídica das mesmas e liberar seu conteúdo intracelular (BRENNAN *et al.*, 2020), porém o uso dessas moléculas detergentes dificultava a incubação da solução na superfície dos eletrodos, a qual escorria por entre os adesivos utilizados para demarcação do eletrodo de trabalho.

Dessa forma, a alternativa foi lisar as SEVs por sonicação e analisar seu comportamento no biossensor. A sonicação foi conduzida por 40 min em uma

frequência de 35 kHz, 80% de frequência, não ultrapassando a temperatura de 20°C, e a amostra foi incubada por 30 min no eletrodo modificado. Houve um aumento na variação do Rct para a detecção das vesículas lisadas, mas esperava-se observar uma variação maior pelo fato de ter o biomarcador mais disponível para interação com os anticorpos da biocamada (Figura 15).

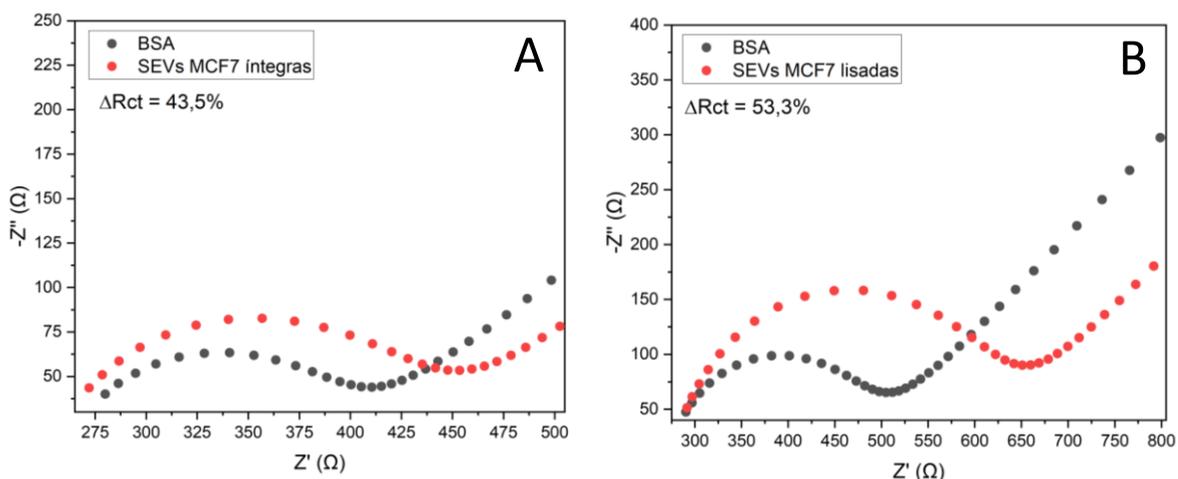


Figura 15 – (A) Diagrama de Nyquist para as etapas antes e após detecção das SEVs MCF7 íntegras e (B) lisadas por sonicação, com ΔR_{ct} entre as etapas indicado.

O discreto aumento na variação do Rct continuou a ser observado mesmo após a lise, levando à hipótese de que o tempo de incubação não era suficiente para a interação antígeno-anticorpo. Apesar de, teoricamente, esta ser uma reação rápida, a lise das vesículas poderia ter resultado em muitos componentes dispersos na amostra, interferindo no acesso ao biomarcador e dificultando a interação, por isso analisou-se um tempo maior para a etapa de detecção, sendo observado um aumento na variação do Rct para a incubação de 1 h (Figura 16). Entretanto, o teste de seletividade usando como amostra negativa as SEVs de A549 não demonstrou a discriminação esperada (Figura 17).

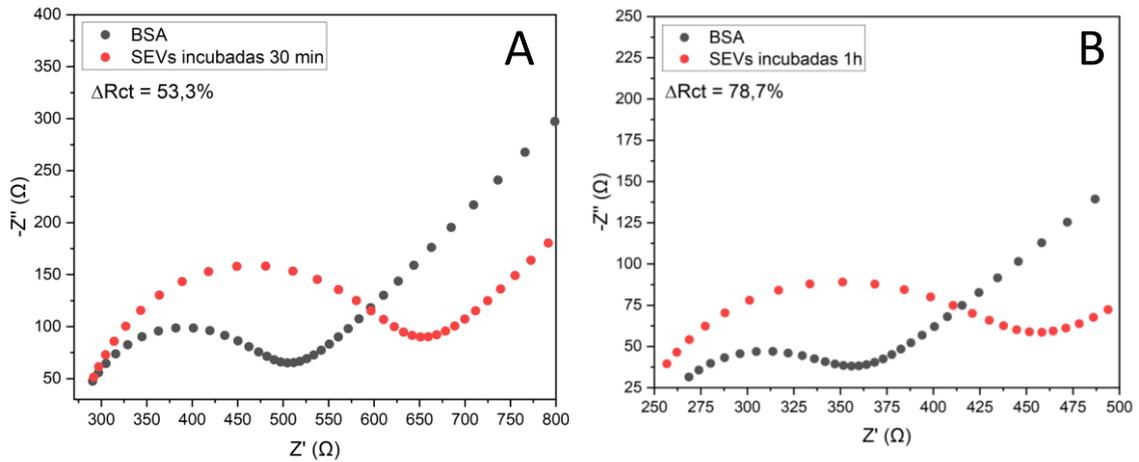


Figura 16 – (A) Diagrama de Nyquist antes e após a etapa de detecção das SEVs MCF7 com incubação por 30 min e (B) 1 h, com ΔR_{ct} entre as etapas indicado.

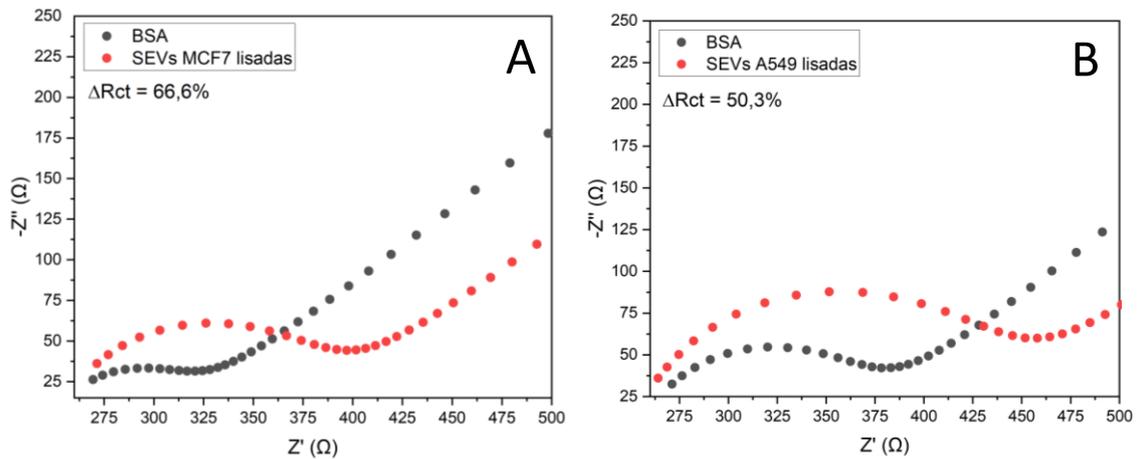


Figura 17 – (A) Diagrama de Nyquist antes e após a etapa de detecção com incubação de 1 hora das SEVs lisadas de MCF7 e (B) A549, com ΔR_{ct} entre as etapas indicado.

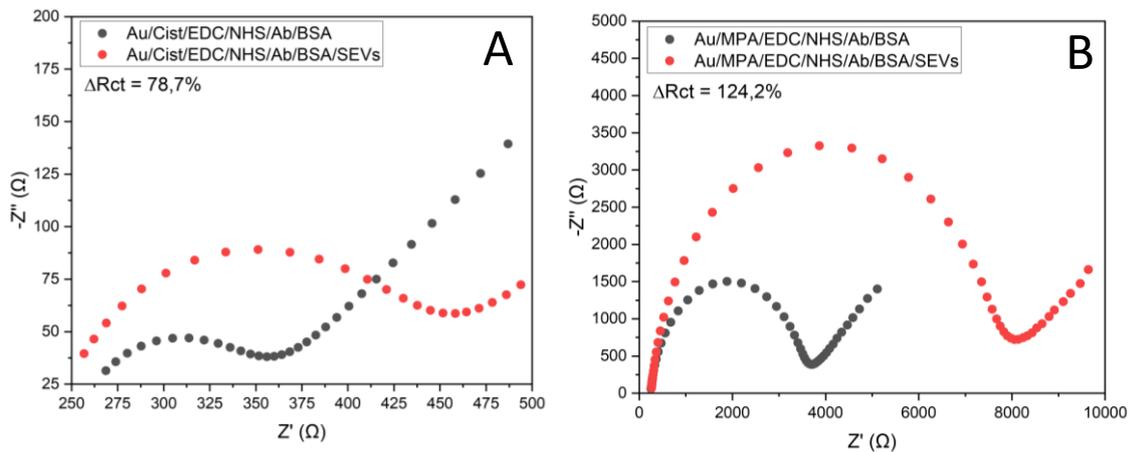


Figura 18 – (A) Diagrama de Nyquist antes e após a etapa de detecção das SEVs MCF7 em SAM construída com cisteamina e (B) MPA, com ΔR_{ct} entre as etapas indicado.

Frente a isso, a estratégia de construção da monocamada foi alterada mais uma vez. A SAM passou a ser construída com MPA 1 mmol/L, anticorpos anti-Del-1 100 µg/mL pré-ativados com EDC/NHS 2 mmol/L/ 5 mmol/L e BSA 1%. A biocamada construída com MPA mostrou uma variação do Rct maior durante a etapa de detecção das SEVs (Figura 18), entretanto, não houve seletividade nem reprodutibilidade quando submetida a análise com SEVs de A549, refletidas na baixa variação de Rct e alto desvio padrão entre as réplicas, como observado na Figura 19C.

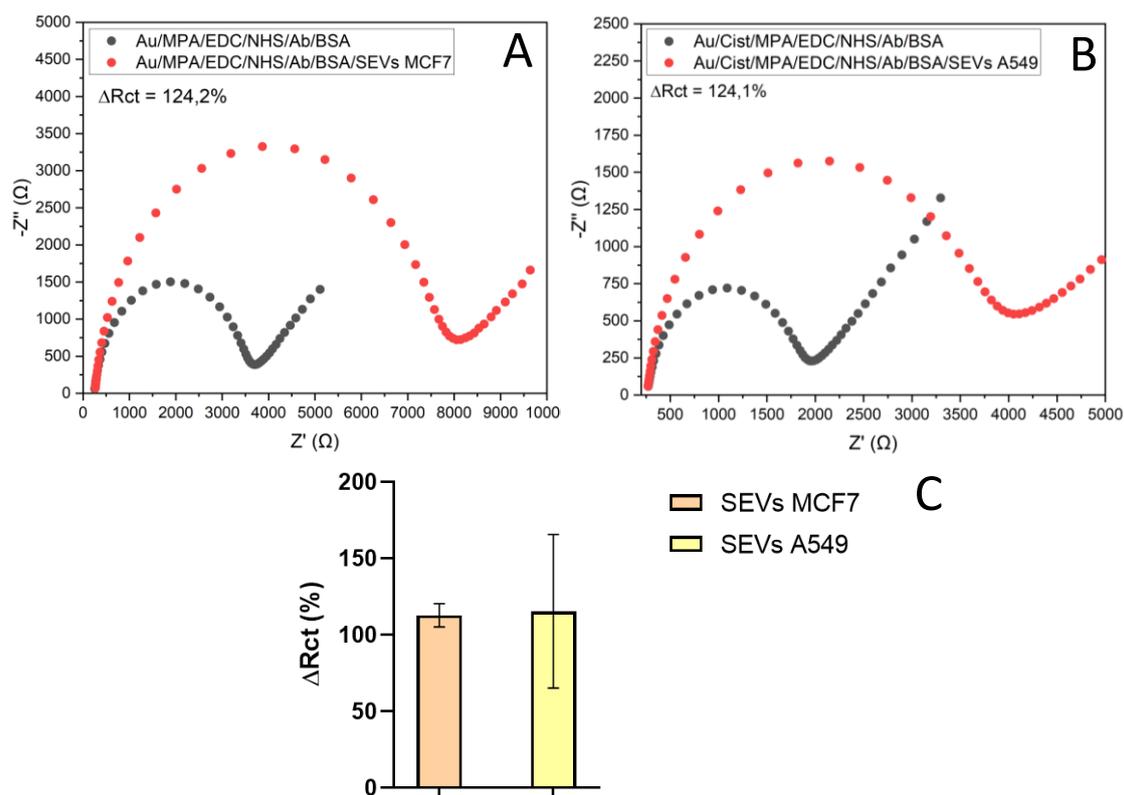


Figura 19 – (A) Diagrama de Nyquist antes e após a etapa de detecção das SEVs MCF7 e (B) A549, em SAM construída com MPA. (C) Gráfico de barras para a detecção das SEVs das duas linhagens, com desvio padrão entre as réplicas (n=3) indicado.

A efetividade da lise das SEVs foi avaliada por NTA pela verificação do tamanho das partículas presentes na amostra. As vesículas foram diluídas 1:100 e analisadas antes e após sonicação (Figura 20). Esperava-se obter valores menores para as partículas após a etapa de sonicação como prova de que as partículas presentes na amostra haviam sido rompidas em outras de menor tamanho. Entretanto, a análise revelou que não houve alteração no tamanho das partículas, indicando que o procedimento não foi capaz de lisar as vesículas (Tabela 2). Dessa forma, fica evidente que as alterações observadas na

etapa de detecção do biossensor foram provenientes de interações inespecíficas, justificando a baixa seletividade e reprodutibilidade do sistema.

SEVs	MCF7 pré sonicação	MCF7 pós sonicação	A549 pré sonicação	A549 pós sonicação
Média (nm)	130,1 +/- 2,4	128,2 +/- 5,4	109,6 +/- 2	113,8 +/- 0,8
Moda (nm)	93,8 +/- 5,9	97,2 +/- 3	94,3 +/- 9,1	83,9 +/- 4,1
Concentração (partículas/mL)	$6,8 \times 10^{10} \pm 1,7 \times 10^9$	$5,7 \times 10^{10} \pm 6 \times 10^9$	$2,8 \times 10^{10} \pm 2,3 \times 10^9$	$4,7 \times 10^{10} \pm 9,6 \times 10^7$

Tabela 2 – Valores de tamanho e concentração para as SEVs de MCF7 e A549 antes e após sonicação obtidos na análise por NTA.

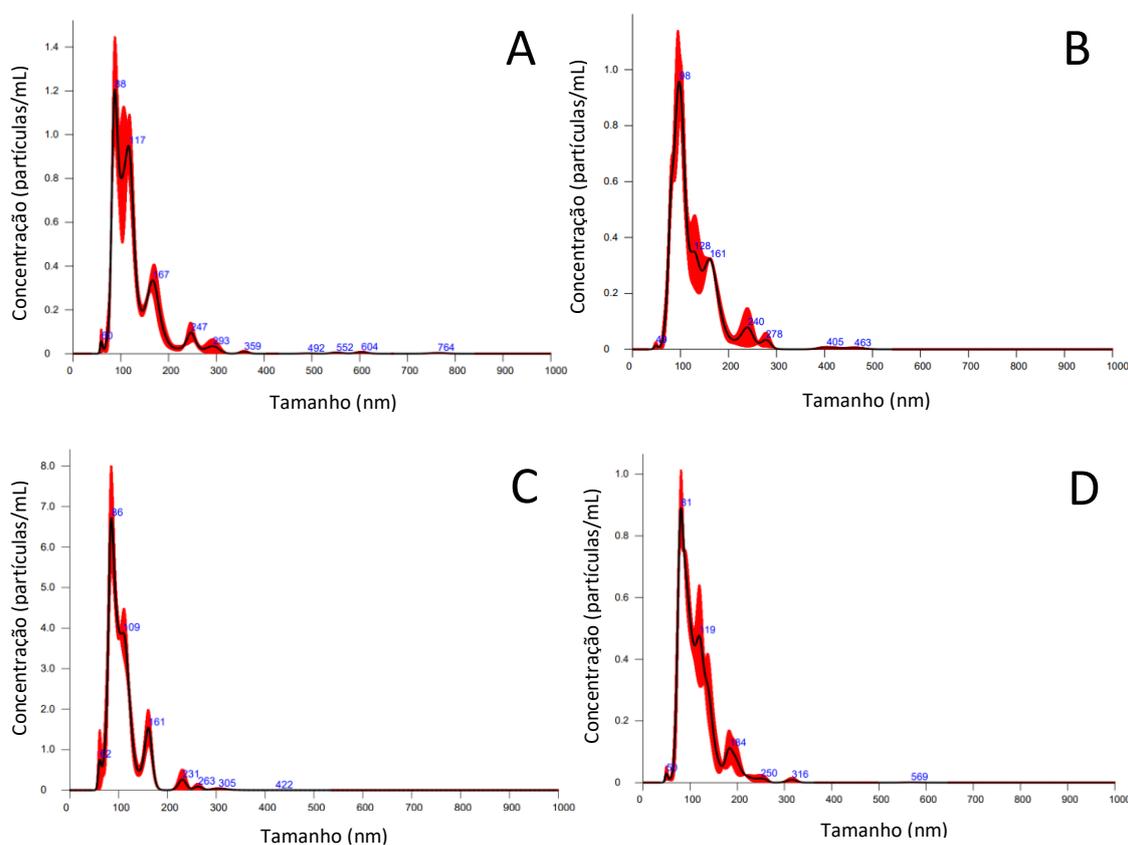


Figura 20 – (A) Gráfico da concentração (partículas/mL) pelo tamanho (nm) das SEVs MCF7 antes e (B) após sonicação, e (C) SEVs A549 antes e (D) após sonicação, com o tamanho médio indicado em cada pico e, em vermelho, a faixa de erro.

5 CONCLUSÃO

Ao todo, foram analisadas 8 estratégias de montagem da SAM em diferentes sistemas (eletrodos de ouro multiplex descartáveis e eletrodos de ouro de barra),

variando parâmetros como classe de moléculas (cisteamina-glutaraldeído; cisteamina-anticorpos pré-ativados; MPA-EDC-NHS; MPA-anticorpos pré-ativados; MUA-MCH-EDC-NHS), tipo de anticorpo (anti-CD63 e anti-Del-1), concentração de anticorpos (4 µg/mL; 8 µg/mL; 40 µg/mL; 100 µg/mL) e tempo de imobilização dos mesmos (1 e 3 h), além de variações na etapa de detecção com diferentes tempos de incubação (30 min; 1 h). Apesar do potencial do sistema, nenhuma das abordagens utilizadas se mostrou capaz de detectar as SEVs, apresentando problemas de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, e os objetivos do trabalho não foram atingidos. Entretanto, o estudo demonstrou como as SEVs agem em diferentes sistemas de detecção e ainda pôde contribuir como um questionamento aos estudos que asseguram a localização celular de Del-1 e seu potencial como biomarcador. Como descrito anteriormente, são necessários mais estudos envolvendo biologia celular e molecular para que essa proteína seja explorada para o diagnóstico de câncer de mama.

O campo de estudos de vesículas extracelulares tem crescido cada vez mais, mas muitos protocolos ainda estão sendo otimizados e falta consenso entre a comunidade científica acerca de algumas questões sobre o assunto. De fato, mais estudos são necessários, principalmente em relação à caracterização proteica das vesículas, seus biomarcadores e suas particularidades em diferentes tipos de tumor.

Ainda, as dificuldades impostas pela pandemia, como longo prazo de entrega de reagentes e limitação da capacidade dos laboratórios, também foi um fator que impactou negativamente no andamento dos experimentos. Entretanto, as adversidades foram dribladas da forma que se mostrou possível para atingir os resultados aqui apresentados.

6 REFERÊNCIAS

- AIZAWA, Masuo et al. Enzyme immunosenser: III. Amperometric determination of human chericenic gonadotropin by membrane-bound antibody. **Analytical biochemistry**, v. 94, n. 1, p. 22-28, 1979.
- ALFONTA, Lital et al. Electrochemical and quartz crystal microbalance detection of the cholera toxin employing horseradish peroxidase and GM1-functionalized liposomes. **Analytical chemistry**, v. 73, n. 21, p. 5287-5295, 2001.
- ALIVISATOS, A. Paul et al. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. **Nature**, v. 382, n. 6592, p. 609-611, 1996.
- AN, Yu et al. An ultrasensitive electrochemical aptasensor for the determination of tumor exosomes based on click chemistry. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 142, p. 111503, 2019.
- ANUSHA, J. R. et al. Electrochemical biosensing of mosquito-borne viral disease, dengue: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 142, p. 111511, 2019.
- AOKA, Yoshikazu et al. The embryonic angiogenic factor Del1 accelerates tumor growth by enhancing vascular formation. **Microvascular research**, v. 64, n. 1, p. 148-161, 2002.
- APANTAKU, Lecia M. Breast cancer diagnosis and screening. **American Family Physician**, v. 62, n. 3, p. 596-602, 2000.
- BORIACHEK, Kseniia et al. An amplification-free electrochemical detection of exosomal miRNA-21 in serum samples. **Analyst**, v. 143, n. 7, p. 1662-1669, 2018.
- BRENNAN, Kieran et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- CAMPANELLA, L. et al. New amperometric and potentiometric immunosensors for anti-human immunoglobulin G determinations. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 55, n. 1, p. 23-32, 1999.
- CHAE, Myung-Sic et al. Enhancing surface functionality of reduced graphene oxide biosensors by oxygen plasma treatment for Alzheimer's disease diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 610-617, 2017.
- CHAMORRO-GARCIA, Alejandro; MERKOÇI, Arben. Nanobiosensors in diagnostics. **Nanobiomedicine**, v. 3, p. 1849543516663574, 2016.
- CHAPUT, Nathalie et al. Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. **Journal of leukocyte biology**, v. 80, n. 3, p. 471-478, 2006.
- CHAUHAN, Ruchika et al. Label-free piezoelectric immunosensor decorated with gold nanoparticles: Kinetic analysis and biosensing application. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 222, p. 804-814, 2016.
- CHEN, Dongli et al. Ultrasensitive electroluminescence biosensor for a breast cancer marker microRNA based on target cyclic regeneration and multi-labeled magnetized nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 9, p. 628, 2019.
- CHEN, Xiaosong et al. A paper-supported aptasensor based on upconversion luminescence resonance energy transfer for the accessible determination of exosomes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 582-588, 2018.

CHEUNG, K. L.; GRAVES, C. R. L.; ROBERTSON, J. F. R. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 26, n. 2, p. 91-102, 2000.

CHOUDHARY, Meenakshi et al. Graphene oxide based label free ultrasensitive immunosensor for lung cancer biomarker, hTERT. **Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 4, n. 4, p. 1-9, 2013.

DA FONSECA ALVES, Rafael et al. Novel electrochemical genosensor for Zika virus based on a poly-(3-amino-4-hydroxybenzoic acid)-modified pencil carbon graphite electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 296, p. 126681, 2019.

D'AMICO, F.; SKARMOUTSOU, E. Quantifying immunogold labelling in transmission electron microscopy. **Journal of microscopy**, v. 230, n. 1, p. 9-15, 2008.

DANIEL, Marie-Christine; ASTRUC, Didier. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical reviews**, v. 104, n. 1, p. 293-346, 2004.

DELLA VENTURA, Bartolomeo et al. Light assisted antibody immobilization for bio-sensing. **Biomedical optics express**, v. 2, n. 11, p. 3223-3231, 2011.

DOI, Toshihiko et al. Safety, pharmacokinetics, and antitumour activity of trastuzumab deruxtecan (DS-8201), a HER2-targeting antibody–drug conjugate, in patients with advanced breast and gastric or gastro-oesophageal tumours: a phase 1 dose-escalation study. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 11, p. 1512-1522, 2017.

DOS SANTOS, David S. et al. Gold nanoparticle embedded, self-sustained chitosan films as substrates for surface-enhanced Raman scattering. **Langmuir**, v. 20, n. 23, p. 10273-10277, 2004.

DUAN, Demin et al. Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 134-141, 2015.

DUFFY, Michael J.; EVOY, Denis; MCDERMOTT, Enda W. CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. **Clinica chimica acta**, v. 411, n. 23-24, p. 1869-1874, 2010.

EL-ANSARY, Afaf; FADDAH, Layla M. Nanoparticles as biochemical sensors. **Nanotechnology, science and applications**, v. 3, p. 65, 2010.

ERTUĞRUL, Hilmiye Deniz; UYGUN, Zihni Onur. Impedimetric biosensors for label-free and enzymeless detection. **State of the Art in Biosensors. Rijeka: IntechOpen**, p. 179-196, 2013.

FAROKHZAD, Omid C. Nanotechnology for drug delivery: the perfect partnership. **Expert opinion on drug delivery**, v. 5, n. 9, p. 927-929, 2008.

FELIX, Fabiana S.; ANGNES, Lúcio. Electrochemical immunosensors—A powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 470-478, 2018.

GAO, Xiaoshan et al. 3D DNA nanosphere-based photoelectrochemical biosensor combined with multiple enzyme-free amplification for ultrasensitive detection of cancer biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 147, p. 111778, 2020.

GIORDANO, Sharon H. Breast cancer in men. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 24, p. 2311-2320, 2018.

GOETZL, Edward J. et al. Traumatic brain injury increases plasma astrocyte-derived exosome levels of neurotoxic complement proteins. **The FASEB Journal**, 2020.

- GONZALEZ-BEGNE, Mireya et al. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). **Journal of proteome research**, v. 8, n. 3, p. 1304-1314, 2009.
- GRIESHABER, Dorothee et al. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.
- HARBECK, N. *et al.* Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, p. 1–31, 2019
- HE, Mei et al. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 19, p. 3773-3780, 2014.
- HENRY, N. Lynn; HAYES, Daniel F. Cancer biomarkers. **Molecular oncology**, v. 6, n. 2, p. 140-146, 2012.
- HIANIK, T. et al. Immunosensors based on supported lipid membranes, protein films and liposomes modified by antibodies. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 57, n. 1-3, p. 201-212, 1999.
- HIDAI, Chiaki et al. Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: an embryonic endothelial cell protein that binds the $\alpha\beta3$ integrin receptor. **Genes & development**, v. 12, n. 1, p. 21-33, 1998.
- HU, Shun-Qin et al. Capacitive immunosensor for transferrin based on an o-aminobenzenthiole oligomer layer. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, n. 2, p. 297-304, 2002.
- HUANG, Xiaohua; EL-SAYED, Mostafa A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of advanced research**, v. 1, n. 1, p. 13-28, 2010.
- IM, Hyungsoon et al. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nanoplasmonic sensor. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 490-495, 2014.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020**: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>> Acesso em 10 dez. 2021.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Conceito e Magnitude do câncer de mama**, 2021. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>>, Acesso em: 10 dez. 2021.
- KALRA, Hina; DRUMMEN, Gregor PC; MATHIVANAN, Suresh. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, p. 170, 2016.
- KAUSHIK, Ajeet et al. Nano-biosensors to detect beta-amyloid for Alzheimer's disease management. **Biosensors and bioelectronics**, v. 80, p. 273-287, 2016.
- KELLER, S. et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. **Kidney international**, v. 72, n. 9, p. 1095-1102, 2007.
- KIMLING, J. et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 32, p. 15700-15707, 2006.
- KOWAL, Joanna; TKACH, Mercedes; THÉRY, Clotilde. Biogenesis and secretion of exosomes. **Current opinion in cell biology**, v. 29, p. 116-125, 2014.

KUMAR, Anil; MAZINDER BORUAH, Bhargavi; LIANG, Xing-Jie. Gold nanoparticles: promising nanomaterials for the diagnosis of cancer and HIV/AIDS. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, 2011.

KUMAR, Naveen et al. Label-free peptide nucleic acid biosensor for visual detection of multiple strains of influenza A virus suitable for field applications. **Analytica chimica acta**, v. 1093, p. 123-130, 2020.

LEE, Myoungro et al. A pretreatment-free electrical capacitance biosensor for exosome detection in undiluted serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 199, p. 113872, 2022.

LEE, Seung-Hwan et al. Del-1 overexpression potentiates lung cancer cell proliferation and invasion. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 468, n. 1-2, p. 92-98, 2015.

LI, Qian; TOFARIS, George K.; DAVIS, Jason J. Concentration-normalized electroanalytical assaying of exosomal markers. **Analytical chemistry**, v. 89, n. 5, p. 3184-3190, 2017.

LI, Qi-Ling et al. Ex vivo experiments of human ovarian cancer ascites-derived exosomes presented by dendritic cells derived from umbilical cord blood for immunotherapy treatment. **Clinical medicine. Oncology**, v. 2, p. CMO. S776, 2008.

LI, Weihua et al. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. **Molecular cancer**, v. 16, n. 1, p. 145, 2017

LI, Zeyang; CHEN, Guan-Yu. Current conjugation methods for immunosensors. **Nanomaterials**, v. 8, n. 5, p. 278, 2018.

LIN, Jiehua; JU, Huangxian. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 8, p. 1461-1470, 2005.

LIN, Y.-W.; LIU, C.-W.; CHANG, H.-T. DNA functionalized gold nanoparticles for bioanalysis. **Analytical Methods**, v. 1, n. 1, p. 14, 2009.

MAHMOOD, Tahrin; YANG, Ping-Chang. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **North American journal of medical sciences**, v. 4, n. 9, p. 429, 2012.

MAVADDAT, Nasim et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 11, p. 812-822, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A mulher e o câncer de mama no Brasil**, s/v., n. 3, s/p., 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//catalogo-expo-mama-3a-ed-2018.pdf>>. Acesso em 10 dez. 2021.

MOON, Pyong-Gon et al. Identification of developmental endothelial locus-1 on circulating extracellular vesicles as a novel biomarker for early breast cancer detection. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 7, p. 1757-1766, 2016.

MOYANO, Daniel F. et al. Modulation of immune response using engineered nanoparticle surfaces. **Small**, v. 12, n. 1, p. 76-82, 2016.

MOYER, Virginia A. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: US Preventive Services Task Force recommendation statement. **Annals of internal medicine**, v. 160, n. 4, p. 271-281, 2014.

ODENTHAL, Katherine J.; GOODING, J. Justin. An introduction to electrochemical DNA biosensors. **Analyst**, v. 132, n. 7, p. 603-610, 2007.

OLIVEIRA-RODRÍGUEZ, Myriam et al. Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids. **Journal of extracellular vesicles**, v. 5, n. 1, p. 31803, 2016.

PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Biosensor technology: a brief history. In: **Sensors and Microsystems**. Springer, Dordrecht, p. 15-23, 2010.

PANG, Yuanfeng et al. Dual-SERS biosensor for one-step detection of microRNAs in exosome and residual plasma of blood samples for diagnosing pancreatic cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 130, p. 204-213, 2019.

PARK, Jongmin et al. Integrated kidney exosome analysis for the detection of kidney transplant rejection. **ACS nano**, v. 11, n. 11, p. 11041-11046, 2017.

PARK, Jun Sung et al. A novel kit for early diagnosis of Alzheimer's disease using a fluorescent nanoparticle imaging. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

PRASAD, K. Sudhakara et al. A low-cost nanomaterial-based electrochemical immunosensor on paper for high-sensitivity early detection of pancreatic cancer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 305, p. 127516, 2020.

RAPOSO, Graca et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 3, p. 1161-1172, 1996.

RODRÍGUEZ, Alexander et al. Electrochemical Immunosensor for the Quantification of S100B at Clinically Relevant Levels Using a Cysteamine Modified Surface. **Sensors**, v. 21, n. 6, p. 1929, 2021.

ROSI, Nathaniel L.; MIRKIN, Chad A. Nanostructures in biodiagnostics. **Chemical reviews**, v. 105, n. 4, p. 1547-1562, 2005.

ROSS, Jeffrey S. et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. **The oncologist**, v. 8, n. 4, p. 307-325, 2003.

ROY, Rohini; CHUN, Jarin; POWELL, Simon N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68-78, 2012.

SCHNEIDER, B. H. et al. Highly sensitive optical chip immunoassays in human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 1-2, p. 13-22, 2000.

SCHÜRPF, Thomas et al. The RGD finger of Del-1 is a unique structural feature critical for integrin binding. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 8, p. 3412-3420, 2012.

SIMPSON, Richard J. et al. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. **Expert review of proteomics**, v. 6, n. 3, p. 267-283, 2009.

SOLANKI, Pratima Rathee et al. Self-assembled monolayer based impedimetric platform for food borne mycotoxin detection. **Nanoscale**, v. 2, n. 12, p. 2811-2817, 2010.

SU, Han et al. Nanomaterial-based biosensors for biological detections. **Arch J**, v. 3, p. 19-29, 2017.

SUN, Jian-Cong et al. High expression level of EDIL3 in HCC predicts poor prognosis of HCC patients. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 36, p. 4611, 2010.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TONG, Mancy et al. Proteomic characterization of macro-, micro- and nano-extracellular vesicles derived from the same first trimester placenta: relevance for fetomaternal communication. **Human reproduction**, v. 31, n. 4, p. 687-699, 2016.

TRILLING, Anke K.; BEEKWILDER, Jules; ZUILHOF, Han. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. **Analyst**, v. 138, n. 6, p. 1619-1627, 2013.

TRILLING, Anke K.; BEEKWILDER, Jules; ZUILHOF, Han. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. **Analyst**, v. 138, n. 6, p. 1619-1627, 2013.

TSANG, Deana Kwong Hong et al. Chemically functionalised Graphene fet Biosensor for the Label-free Sensing of exosomes. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

VAIDYANATHAN, Ramanathan et al. Detecting exosomes specifically: a multiplexed device based on alternating current electrohydrodynamic induced nanoshearing. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 22, p. 11125-11132, 2014.

VALADI, Hadi et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, v. 9, n. 6, p. 654-659, 2007.

VAN DORST, Bieke et al. Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1178-1194, 2010.

VASHIST, Sandeep Kumar et al. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. **Chemical reviews**, v. 114, n. 21, p. 11083-11130, 2014.

WANG, Haiyan et al. Competitive electrochemical aptasensor based on a cDNA-ferrocene/MXene probe for detection of breast cancer marker Mucin1. **Analytica chimica acta**, v. 1094, p. 18-25, 2020.

WANG, Hongsu et al. Electrochemical immunosensor based on an antibody-hierarchical mesoporous SiO₂ for the detection of Staphylococcus aureus. **RSC advances**, v. 9, n. 28, p. 16278-16287, 2019.

WANG, Joseph. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887-1892, 2006.

WANG, Mengchuan et al. Effect of exosome biomarkers for diagnosis and prognosis of breast cancer patients. **Clinical and Translational Oncology**, v. 20, n. 7, p. 906-911, 2018.

WANG, Rui et al. A novel label-free electrochemical immunosensor for ultra-sensitively detecting prostate specific antigen based on the enhanced catalytic currents of oxygen reduction catalyzed by core-shell Au@Pt nanocrystals. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 276-281, 2018.

WANG, Yifei et al. Rapid Differentiation of Host and Parasitic Exosome Vesicles Using Microfluidic Photonic Crystal Biosensor. **ACS sensors**, v. 3, n. 9, p. 1616-1621, 2018.

WINTER, Patrick M. et al. Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel $\alpha\beta 3$ -targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. **Cancer research**, v. 63, n. 18, p. 5838-5843, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Breast cancer**, s/ v., s/ n., s/ p., 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>>. Acesso em 10 dez. 2021.

XU, Chengnan et al. An unmodified gold nanorods-based DNA colorimetric biosensor with enzyme-free hybridization chain reaction amplification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 273, p. 642-648, 2018.

YADAV, Sharda et al. An electrochemical method for the detection of disease-specific exosomes. **ChemElectroChem**, v. 4, n. 4, p. 967-971, 2017.

YANG, Bin et al. Double signal amplification strategy for ultrasensitive electrochemical biosensor based on nuclease and quantum dot-DNA nanocomposites in the detection of breast cancer 1 gene mutation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 142, p. 111544, 2019.

YANG, Xuan et al. Gold nanomaterials at work in biomedicine. **Chemical reviews**, v. 115, n. 19, p. 10410-10488, 2015.

ZHANG, Chao et al. Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 1, p. 96-99, 2002.

ZHANG, Xu et al. Exosomes in cancer: small particle, big player. **Journal of hematology & oncology**, v. 8, n. 1, p. 83, 2015.

ZHANG, YuYong et al. Gold nanolabels and enzymatic recycling dual amplification-based electrochemical immunosensor for the highly sensitive detection of carcinoembryonic antigen. **Science China Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 1770-1776, 2011.