

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA SUSTENTABILIDADE
CAMPUS SOROCABA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA, QUÍMICA E MATEMÁTICA

RAQUEL GURGE BUENO

**ESTUDO DO STATUS SOROLÓGICO DE PACIENTES COM DOENÇAS DO
ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA POR MEIO DO DESENVOLVIMENTO
DE UM NANOIMUNOSSENSOR DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Sorocaba

2024

RAQUEL GURGE BUENO

**ESTUDO DO STATUS SOROLÓGICO DE PACIENTES COM DOENÇAS DO
ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA POR MEIO DO DESENVOLVIMENTO
DE UM NANOIMUNOSSENSOR DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de Física,
Química e Matemática da Universidade
Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba,
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Licenciada em Física.

Orientação: Prof. Dr. Fabio de Lima Leite

Sorocaba

2024

Bueno, Raquel Gurge

Estudo do status sorológico de pacientes com doenças do espectro da neuromielite óptica por meio do desenvolvimento de um nanoimunossensor de nanopartículas de prata / Raquel Gurge Bueno -- 2024. 50f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Fabio de Lima Leite

Banca Examinadora: Fabio de Lima Leite, Rafael Henrique Longaresi, Giovanni Pimenta Mambrini

Bibliografia

1. Neuromielite óptica. 2. Nanobiossensor . 3. Nanopartículas de prata. I. Bueno, Raquel Gurge. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8 6979

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS****COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM FÍSICA - SOROCABA - CCFL-So/CCTS**

Rod. João Leme dos Santos km 110 - SP-264, s/n - Bairro Itinga, Sorocaba/SP, CEP 18052-780

Telefone: (15) 32298859 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 1/2024/CCFL-So/CCTS

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso**Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)****FOLHA DE APROVAÇÃO****RAQUEL GURGE BUENO****ESTUDO DO STATUS SOROLÓGICO DE PACIENTES COM DOENÇAS DO ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA POR MEIO DO DESENVOLVIMENTO DE UM NANOIMUNOSSENSOR DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA****Trabalho de Conclusão de Curso****Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba**

Sorocaba, 30 de janeiro de 2024

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Prof. Dr. Fabio de Lima Leite
Membro da Banca 1	Prof. Dr. Rafael Henrique Longaresi
Membro da Banca 2	Prof. Dr. Giovanni Pimenta Mambrini



Documento assinado eletronicamente por **Fabio de Lima Leite, Docente**, em 30/01/2024, às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovanni Pimenta Mambrini, Docente**, em 30/01/2024, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Henriques Longaresi, Docente**, em 01/02/2024, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1325888** e o código CRC **AA6D111C**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.000826/2024-92

SEI nº 1325888

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

Dedico este trabalho àqueles que valorizam e trabalham na promoção das ciências.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, cujo apoio e amor incondicional foi a âncora nos momentos mais desafiadores dessa jornada, pois mesmo com a distância física sempre se fez presente, me incentivando a ser melhor e a buscar meus objetivos.

Ao Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica, pela oportunidade de aprender e crescer ao lado de colegas tão dedicados em fazer ciência e através disso, transformar a vida de diversas pessoas pelo mundo. Em especial a Dr. Akemi Martins Higa, que desde o primeiro dia no laboratório esteve ao meu lado para me ensinar e me apoiar no que fosse necessário e ao meu orientador e amigo, Professor Dr. Fabio Lima Leite, por suas correções e incentivos na vida profissional, acadêmica e pessoal.

Aos amigos que fiz durante esse período, em especial a Julia Elisa e Rodrigo Dantas que sempre estiveram ao meu lado e a todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa e para minha trajetória nesses anos, enriquecendo meu processo de aprendizado.

À Deus, pois sem Ele nada disso poderia fazer.

RESUMO

No cenário atual, o diagnóstico das doenças do espectro da neuromielite óptica baseia-se principalmente na detecção de um biomarcador específico, o autoanticorpo AQP4-IgG, que atinge a proteína Aquaporina-4 (AQP4) nos astrócitos do Sistema Nervoso Central. No entanto, cerca de 10 a 27% dos pacientes com evidências clínicas da patologia são classificados como soronegativos para a presença do autoanticorpo em questão, de acordo com o teste recomendado pelo Painel Internacional para o Diagnóstico de Neuromielite Óptica, o que dificulta o diagnóstico e retarda o tratamento. Diante desse desafio, o presente trabalho concentrou-se no desenvolvimento de um nanobiossensor utilizando nanopartículas de prata funcionalizadas com o epítipo AQP4₆₁₋₇₀ a fim de aprimorar o índice de detecção do AQP4-IgG, como resultado do nanobiossensor desenvolvido foi obtido uma sensibilidade de 84,62%, superando a abordagem convencional, porém com índice de especificidade de 66,67% indicando a necessidade de futuras pesquisas para o aprimoramento desse aspecto do diagnóstico.

Palavras-chave: Neuromielite óptica; nanobiossensor e nanopartículas de prata.

ABSTRACT

In the current scenario, the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders is mainly based on the detection of a specific biomarker, the AQP4-IgG autoantibody, which targets the Aquaporin-4 (AQP4) protein in astrocytes of the Central Nervous System. However, approximately 10 to 27% of patients with clinical evidence of the pathology are classified as seronegative for the presence of the autoantibody in question, according to the test recommended by the International Panel for the Diagnosis of Neuromyelitis Optica, which makes it difficult to diagnose and delays treatment. Faced with this challenge, the present work focused on the development of a nanobiosensor using silver nanoparticles functionalized with the AQP4₆₁₋₇₀ epitope in order to improve the detection rate of AQP4-IgG. As a result of the developed nanobiosensor, a sensitivity of 84,62%, surpassing the conventional approach, but with a specificity rate of 66,67%, indicating the need for future research to improve this aspect of the diagnosis.

Keywords: Neuromyelitis optica; nanobiosensor and silver nanoparticles.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	SÍNTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL	14
2.1	CONFIGURAÇÃO E FUNCIONAMENTO DOS NEURÔNIOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	14
2.1.1	Aquaporina – 4	15
2.2	DOENÇAS NEUROLÓGICAS AUTOIMUNES	18
2.2.1	Neuromielite óptica	19
2.3	NANOTECNOLOGIA.....	22
2.3.1	Nanopartículas	23
2.3.1.1	Síntese, funcionalização e caracterização de NPs	24
2.3.1.2	Nanopartículas de prata	25
2.3.1.2.1	Síntese e funcionalização das AgNPS	27
2.3.1.2.2	Nanoimunossensor de AgNPS	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	GERAL	30
3.2	ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	MATERIAIS	31
4.2	MÉTODOS	31
4.2.1	Síntese das nanopartículas de prata	31
4.2.2	Funcionalização e incubação com anticorpos	32
4.2.3	Caracterização dos processos de síntese e funcionalização das nanopartículas	33
4.2.3.1	Imageamento por AFM.....	33
4.2.3.2	Análise das propriedades ópticas das nanopartículas.....	33
4.2.4	Obtenção de dados e análise das medidas	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	35
5.2	INTERAÇÃO COM ANTICORPO	36
5.2.1	Pacientes soropositivos pelo CBA	36
5.2.2	Pacientes com ENMO soronegativos pelo CBA	38
5.2.3	Pacientes saudáveis ou com EM	39
5.3	ANÁLISE DOS RESULTADOS	41
5.4	PUBLICAÇÃO	43
6	CONCLUSÃO	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da ciência atrelada a medicina, muito se tem avançado no que diz respeito à compreensão das doenças inflamatórias que atingem o sistema nervoso central (SNC), principalmente na diferenciação daquelas que possuem características semelhantes em suas fases iniciais, tais como a encefalomielite disseminada aguda (ADEM, do inglês *Acute Disseminated Encephalomyelitis*); a esclerose múltipla (EM) e a neuromielite óptica (NMO), sendo essa última a principal patologia discutida no presente trabalho (Cobo-calvo; Vukusic; Marignier, 2019).

A NMO é uma doença inflamatória, crônica e autoimune que acomete o SNC, causando perda dos movimentos, fadiga, distúrbios visuais, sensoriais e motores, porém quando levamos em consideração apenas os sintomas apresentados pelo paciente, muitas das vezes pode ocorrer a sobreposição entre diversas outras patologias, o que dificulta um diagnóstico preciso da doença e, conseqüentemente, o seu tratamento (Cobo-calvo; Vukusic; Marignier, 2019; Dendrou; Fugger; Friese, 2015).

Este cenário foi modificado em 2004, quando Lennon e colaboradores descobriram um autoanticorpo presente exclusivamente nos pacientes com NMO, o NMO-IgG (Lennon *et al.*, 2004). No ano seguinte o mesmo grupo de pesquisadores identificou o antígeno-alvo deste autoanticorpo, a aquaporina-4 (AQP4), uma proteína presente nos podócitos dos astrócitos que formam a barreira hematoencefálica (BHE) e que desempenha uma importante função na regulação do transporte de água entre os vasos sanguíneos e as células cerebrais (Lennon *et al.*, 2005).

Sendo assim, fez-se necessário que o critério de diagnóstico para o paciente enfermo sofresse diversas alterações, de maneira que não só os sintomas fossem levados em consideração, o que poderia induzi-los ao erro, mas também esse biomarcador sorológico específico da doença (Cobo-calvo; Vukusic; Marignier, 2019).

Desta forma, a fim de se evitar equívocos no tratamento, foi instaurado, em julho de 2015, o Painel Internacional para o Diagnóstico da NMO (IPND, do inglês *International Panel for NMO Diagnosis*), o qual definiu um novo termo para designar a síndrome: doenças do espectro da neuromielite óptica (ENMO ou NMOSD, do inglês *Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders*) determinando assim os novos parâmetros para o diagnóstico, que incluem as manifestações clínicas, o status sorológico para o

anti-AQP4 e a exclusão de outras patologias similares (Frota; Mendes; Vaconcelos, 2016).

Atualmente a ferramenta mais indicada para identificar este biomarcador sorológico é o ensaio com base em células (CBA, do inglês *Cell-Based Assay*), o qual apesar de específico, apresenta um valor de sensibilidade em torno de 76%, ou seja, demonstra um limite de detecção o qual classifica 10 a 27% dos casos de pacientes com evidências clínicas da patologia como “soronegativos” ou como “não identificados”, resultando em um atraso no tratamento, que muitas vezes ocasiona em danos irreparáveis ao SNC (Bennett *et al.*, 2015; Higa, 2022; Prasad; Chen, 2019).

Dada esta problemática, que interfere diretamente na vida de milhares de pessoas pelo mundo, diversas pesquisas começaram a ser desenvolvidas com o objetivo de integrar os estudos da nanotecnologia no campo de pesquisa das doenças desmielinizantes e este tem sido um campo promissor, principalmente quando relacionamos às nanopartículas utilizadas no sensoriamento de doenças, já que estas podem ser sintetizadas de acordo com as características desejadas e, através das suas propriedades ópticas sinalizarem interações moleculares específicas (Higa, 2022; Ponnuchamy; Ramkumar; Pugazhendhi, 2019).

Essa capacidade de converter a interação entre uma biomolécula e seu alvo específico em um sinal que pode ser detectado e medido é uma característica atrelada ao desenvolvimento de nanobiossensores, os quais podem ser definidos como estruturas que combinam elementos biológicos, tais como enzimas, proteínas ou DNA e são sintetizadas para que ocorra uma interação específica; um subconjunto desses nanobiossensores são os nanoimunossensores os quais são projetados para detecção de eventos relacionados ao sistema imunológico, através da interação entre antígenos e anticorpos (Higa *et al.*, 2019; Higa, 2017).

Considerando a necessidade eminente de aprimoramento da detecção da anti-AQP4 em pacientes com ENMO, o presente trabalho buscou fazer um estudo do status sorológico de pacientes com ENMO por meio do desenvolvimento de um nanoimunossensor de nanopartículas de prata (AgNPs) devido à sua alta sensibilidade e propriedades ópticas, dessa forma quando um determinado peptídeo é conjugado às AgNPs ocorre a ligação ao anticorpo específico daquela sequência e assim, as AgNPs aproximam-se num processo denominado agregação, promovendo

alterações visíveis e mensuráveis na sua coloração (Higa *et al.*, 2019; Hill; Li, 2017; Yeo *et al.*, 2015).

Os desdobramentos deste trabalho sugerem caminhos promissores para futuras investigações e posterior adesão desse diagnóstico na prática clínica para a detecção da doença e ainda pode gerar um diagnóstico completo com análises quantitativas e qualitativas *in situ*, com alta acurácia, associada ao baixo custo e rapidez na análise.

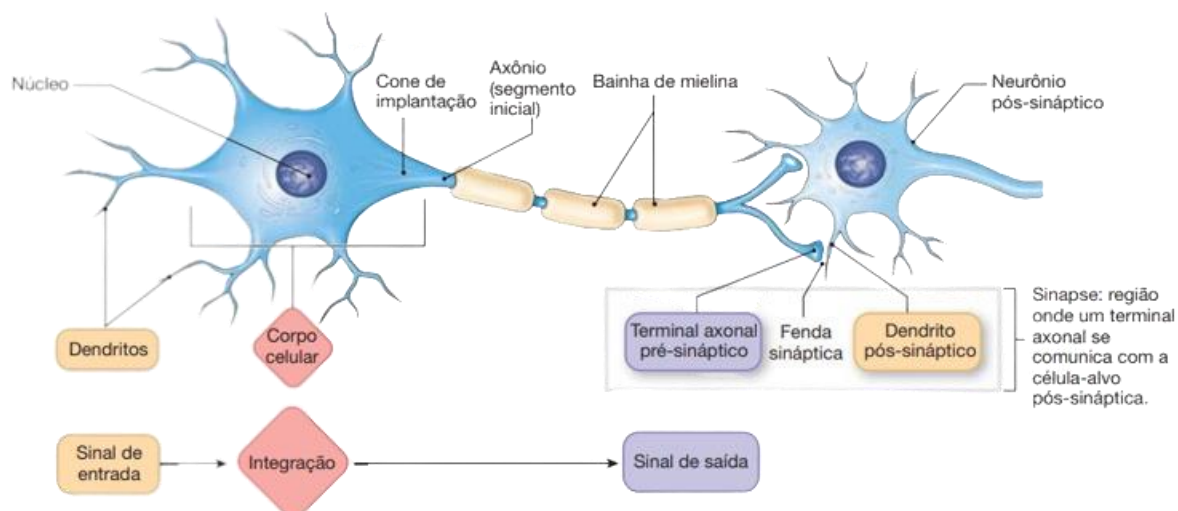
2 SÍNTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL

2.1 CONFIGURAÇÃO E FUNCIONAMENTO DOS NEURÔNIOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O sistema nervoso pode ser dividido em duas partes: sistema nervoso periférico (SNP) e sistema nervoso central (SNC); este último corresponde ao ambiente de estudo do presente trabalho o qual é composto pelo encéfalo e pela medula espinhal sendo o responsável por regular as nossas funções vitais e processos cognitivos; essa rede é composta por bilhões de células nervosas, as quais são chamadas de neurônios (Silverthorn, 2017).

Conforme visto de maneira generalizada na Figura 1, os neurônios possuem uma estrutura celular que pode se apresentar de diversas formas devido as suas ramificações, que possibilitam a comunicação intra e extracelular, da esquerda para a direita podemos visualizar que os dendritos recebem os sinais advindos das células vizinhas e são responsáveis por transferí-los para uma região de integração dentro do neurônio, o corpo celular opera de forma análoga a uma célula comum, direcionando a atividade celular e armazenando o material genético, a região prolongada que se estende para fora do corpo celular é denominada axônio e é responsável por transmitir sinais químicos e elétricos de saída para as células-alvo, as sinapses (Silverthorn, 2017).

Figura 1 – Configuração de um neurônio



Fonte: Silverthorn (2017)

Ao redor do axônio é possível observar a bainha de mielina, uma camada isolante com a importante função de acelerar a condução dos impulsos nervosos entre os neurônios, visto que impede o contato com o líquido extracelular, o qual apresenta em sua composição íons de sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) entre outros. Essa bainha é formada pelos oligodendrócitos que são um dos tipos de células da glia, as quais também são conhecidas como células de suporte que desempenham diversas funções físicas e bioquímicas para que haja o processamento rápido das informações no SNC (Dendrou; Fugger; Friese, 2015; Lüders *et al.*, 2019; Russi; Brown, 2015).

Além dos oligodendrócitos, há também outros três tipos de células da glia presentes no SNC: a micróglia, que está associada às respostas imunológicas; as células ependimárias, que atuam na regulação da homeostase no SNC através da criação de uma camada com permeabilidade seletiva e os astrócitos, que correspondem a cerca da metade das células do encéfalo e possuem múltiplas funções de suporte, como liberação de substâncias químicas, abastecimento dos neurônios para produção e armazenamento de energia (ATP), regulação do transporte de materiais na Barreira Hematoencefálica (BHE), que é a camada protetora do SNC, e auxílio para manter a homeostasia do líquido extracelular do SNC captando íons k^+ e água (Rojas; Ritter, 2011; Silverthorn, 2017).

O citoesqueleto dos astrócitos é formado por uma rede complexa de filamentos de proteína, as quais determinam a forma e função que será desempenhada por ele, no presente trabalho nos debruçaremos no estudo sobre àqueles formados pela aquaporina-4 (AQP4), que forma os canais de água do SNC e desempenha uma importante função na regulação da homeostase da BHE (Gomes; Tortelli; Diniz, 2013; Gondim; Thomas; Graça, 2016).

2.1.1 Aquaporina – 4

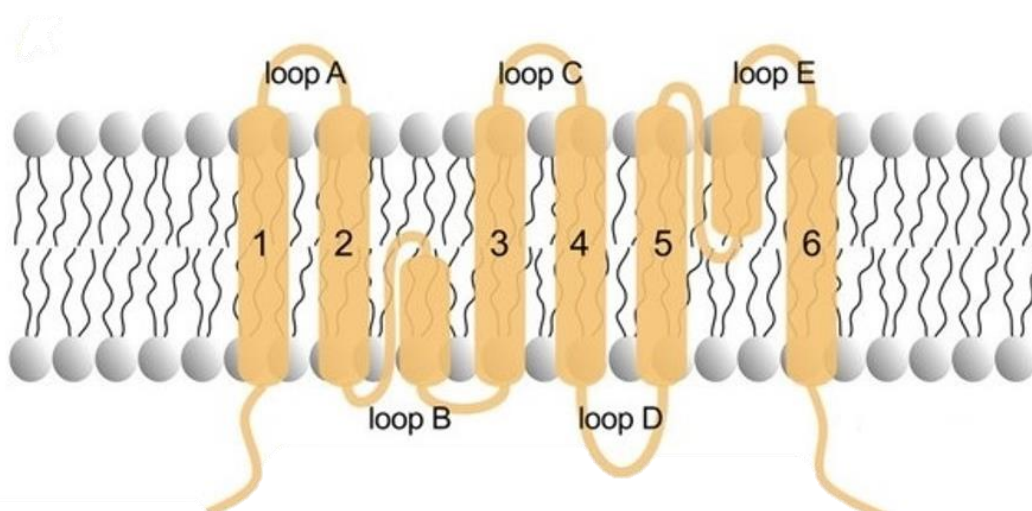
A descoberta da primeira aquaporina ocorreu em 1992, através dos trabalhos conduzidos pelo bioquímico e médico norte-americano Peter Agre e colaboradores, ao desenvolver um trabalho com a proteína CHIP 28 (do inglês *Channel Integral Protein*) onde foi constatado que as células que tinham essa proteína quando inseridas em um meio aquoso adquiriam uma alta permeabilidade à água, ao contrário das que não a possuíam. Posteriormente essa proteína passou a ser denominada

aquaporina-1 (AQP1), devido às palavras em latim *aqua* que significa água e *porus* que significa poro (Ferreira, 2014; Romeiro *et al.*, 2006).

Com o passar do tempo mais de duzentas aquaporinas foram identificadas em centenas de espécies de seres vivos, incluindo bactérias, fungos, plantas, invertebrados e mamíferos; sendo 13 delas encontradas nos seres humanos (AQP0-12) desenvolvendo um papel fundamental na regulação do transporte de água através das membranas celulares, em resposta ao gradiente osmótico, possibilitando também que as células, que necessitam da passagem rápida das moléculas de água, desempenhem suas respectivas funções (Higa, 2022; Romeiro *et al.*, 2006).

As aquaporinas dos tipos 1, 3, 4, 5, 8, 9 e 11 foram identificadas especificamente no tecido cerebral em diferentes células e localizações, entretanto a Aquaporina-4 (AQP4) apresenta maior distribuição no SNC, principalmente na medula espinhal e nos nervos ópticos, que pode ser visualizada na representação esquemática da figura 2. Sua estrutura possui seis segmentos helicoidais de membrana (1-6) e dois segmentos helicoidais menores, que formam um poro de água. Na estrutura, também há três alças extracelulares que compõem os loops A, C e E, e duas intracelulares, que correspondem aos loops B e D (Higa, 2022; Romeiro *et al.*, 2006).

Figura 2 – Representação esquemática da topologia da proteína AQP4



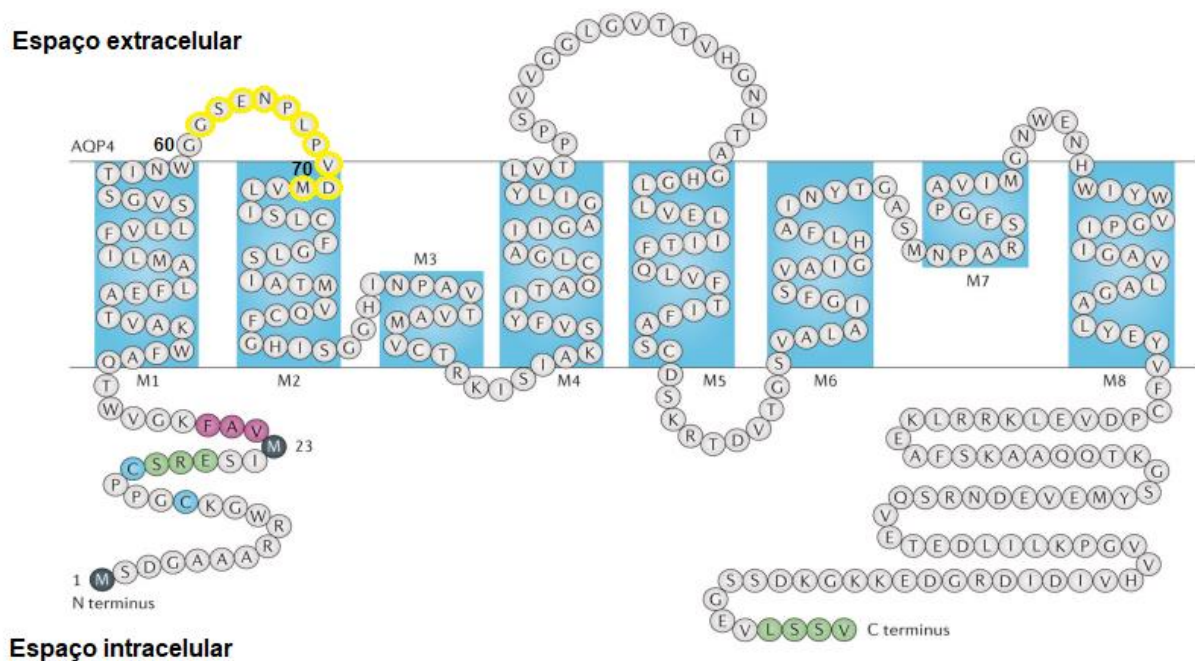
Fonte: Adaptado de Nesverova e Törnroth-Horsefield (2019)

Além de servir como via de transporte de água através dos compartimentos do encéfalo, do sistema circulatório e do líquido cefalorraquidiano a AQP4 também é a responsável pela migração dos astrócitos, formação de cicatriz pelas células da glia,

transdução de sinal neuronal e de neuroinflamações que possam vir a ocorrer (Higa, 2022).

Essa estrutura da AQP4 é formada por uma sequência de 301 a 323 aminoácidos, que se ligam entre si por meio de ligações peptídicas, conforme representado na figura 3, formando cadeias que, por sua vez, se doblam e se organizam em estruturas complexas para formar a proteína em si. Essa organização não apenas confere à AQP4 suas propriedades funcionais, mas também define os locais específicos onde deverão ocorrer ligações com um anticorpo ou outra molécula de reconhecimento, essas “porções” da proteína são denominadas epítomos (Nelson; Cox, 2014; Romeiro *et al.*, 2006).

Figura 3 – Diagrama esquemático dos aminoácidos que formam a proteína AQP4 com o epítomo utilizado no presente trabalho marcado em amarelo



Fonte: Modificado de Papadopoulos e Verkman (2013)

Essas interações entre os epítomos da proteína e os anticorpos, em condições plenas de saúde, são fundamentais para o reconhecimento de substâncias estranhas, impulsionando uma resposta do sistema imunológico. Entretanto, quando o indivíduo é acometido de doenças neurológicas autoimunes específicas, que serão tratadas

posteriormente, essa interação passa a ser extremamente danosa (Higa, 2022; Nelson; Cox, 2014; Romeiro *et al.*, 2006).

No que diz respeito a identificação dessas porções da proteína, precisamos levar em conta que os epítomos correspondem a uma sequência específica de aminoácidos; sendo assim, podemos numerá-los de acordo com a posição que aparecem. No caso do presente trabalho, nos concentraremos no estudo sobre o epítomo AQP4₆₁₋₇₀, indicado em amarelo na figura anterior.

2.2 DOENÇAS NEUROLÓGICAS AUTOIMUNES

Uma das principais propriedades do nosso sistema imunológico, em condições normais, é a sua capacidade de reagir e desencadear uma resposta de defesa a uma enorme variedade de substâncias consideradas estranhas, denominadas antígenos, além disso, em um indivíduo saudável existe também uma série de mecanismos que diferenciam antígenos próprios e os não próprios, impedindo que o corpo ataque as células do próprio sujeito. Se esses mecanismos falham e passam a atacar as células funcionais do corpo, desencadeiam as doenças chamadas autoimunes (Abbas; Lichtnan; Pillai, 2014).

No caso das doenças neurológicas autoimunes, o SNC muitas vezes é afetado de maneira irreversível, visto que nos pacientes acometidos por essas enfermidades ocorre uma falha nos mecanismos de reconhecimento da BHE, permitindo a entrada das células T, de defesa, que se tornam auto-reativas e atacam as células neuronais, as quais devido sua capacidade muito limitada de regeneração sofrem danos, muitas vezes irreparáveis (Riedhammer; Weissert, 2015; Russi; Brown, 2015; Zhang; Tian; Li, 2019).

A Esclerose múltipla (EM) é um exemplo de uma doença neurológica autoimune que compromete o SNC e acomete cerca de 2,5 milhões de pessoas pelo mundo, a qual devido ao ataque e comprometimento da bainha de mielina, formada pelos oligodendrócitos, os impulsos elétricos do cérebro acabam passando de uma forma mais vagarosa pelos axônios. Causando a perda do controle do indivíduo o que repercute em diversos sintomas, tais como: perda dos movimentos, fadiga, distúrbios visuais, sensoriais e motores, dores nas pernas e mãos o que acarreta muitas vezes em dificuldades ou perdas totais da capacidade locomotora (Dendrou; Fugger; Friese,

2015). Inicialmente essa desmielinização é acompanhada da remielinização, porém, como se trata de uma doença autoimune em pouco tempo a mielina é atacada novamente, resultando em perdas irreversíveis ao axônio (Atkins *et al.*, 2012).

Outro exemplo de uma doença neurológica autoimune é a Neuromielite Óptica (NMO), principal patologia discutida neste trabalho, a qual apesar de apresentar danificações nos oligodendrócitos, diferentemente da EM, possui como fator principal para a agravação dos sintomas, o comprometimento dos astrócitos, os quais como citado anteriormente são responsáveis pela nutrição e sustentação dos neurônios, devido ao ataque dos autoanticorpos a proteína AQP4, induzindo a toxicidade das células astrocíticas, causando inflamações e posteriormente a perda neuronal (Takeshita *et al.*, 2016).

Devido à similaridade dos sintomas apresentados na fase inicial, durante muito tempo pacientes com NMO eram diagnosticados com EM e conseqüentemente recebiam um tratamento inadequado. Entretanto, através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), Lennon e colaboradores detectaram e descreveram um autoanticorpo específico para NMO que não era encontrado em pacientes com EM, o anti-AQP4, o qual foi acrescentado aos critérios preexistentes para diagnóstico da NMO possibilitando que tanto a detecção quanto o tratamento fossem realizados de maneira mais específica para cada patologia (Bennett *et al.*, 2015; Lennon *et al.*, 2004).

2.2.1 Neuromielite óptica

O termo “Neuromielite óptica”, foi citado pela primeira vez em 1894 por Eugène Devic e seu aluno Fernand Gault em um estudo publicado de pacientes numa fase inicial de mielite transversa (MT) e neurite óptica (NO) bilateral, tornando-a conhecida também como Doença de Devic (Zarei *et al.*, 2018).

A NMO é caracterizada como uma doença inflamatória, desmielinizante e autoimune do SNC, com taxa de mortalidade anual variando de 9% a 15% e que provoca diversos sintomas devido ao comprometimento dos nervos ópticos e da medula espinhal podendo envolver também o encéfalo, tronco encefálico e a área postrema; entre as manifestações clínicas da doença estão: neurite óptica que

corresponde à perda da visão funcional; mielite aguda que devido a inflamação na medula espinhal pode provocar diversos sintomas como fraqueza muscular, disfunção urinária, dormência e problemas na coordenação e equilíbrio do corpo; síndrome da área postrema que provoca episódios de náuseas e vômitos sem explicação aparente; síndrome aguda de tronco encefálico a qual pode se manifestar através de dificuldades respiratórias e/ou perda da consciência; narcolepsia sintomática que corresponde ao distúrbio do sono e síndrome cerebral sintomática que pode se manifestar através de dores de cabeça, mudanças cognitivas, perda da sensibilidade etc. (Frota; Mendes; Vaconcelos, 2016; Higa, 2022; Shahmohammadi; Doosti; Shahmohammadi, 2019; Zarei *et al.*, 2018).

Dentre os fenótipos clínicos citados, o mais comum é a NO que acomete cerca de 70 a 88% dos pacientes e se apresenta de maneira mais aguda nos casos de NMO (em comparação com a EM); o segundo caso mais comum, 30% dos adultos diagnosticados, é a mielite aguda (Cobo-calvo; Vukusic; Marignier, 2019).

Conforme descrito anteriormente, durante muito tempo a NMO foi considerada como uma variação da EM, já que até então não haviam características que as distinguiam, senão o fenótipo clínico o qual apresenta algumas características comuns às duas patologias. Com isso diversos pacientes portadores da NMO eram tratados com fármacos específicos para o controle da EM o que além de ineficaz podem inclusive acentuar os sintomas (Higa, 2022; Zarei *et al.*, 2018).

Essa realidade mudou quando foi encontrado um autoanticorpo, da classe das imunoglobulinas G (IgG), específico para a NMO, o NMO-IgG. O autoanticorpo em questão é o anti-AQP4 o qual tem como alvo a proteína AQP4 que está localizada no encéfalo, cuja expressão é alta nos processos podais dos astrócitos que compõem a BHE, funcionando como um canal de água para a irrigação e distribuição de solutos no SNC, como se trata de uma doença autoimune o autoanticorpo anti-AQP4 atinge a própria proteína causando comprometimento dos astrócitos e lesões neuronais irreversíveis (Seay; Rucker, 2019).

Atualmente, o teste mais indicado para a detecção deste marcador biológico no paciente com indícios do NMO é o ensaio com base em células (CBA, do inglês *Cell-Based Assay*), o qual apresenta 76,7% de sensibilidade e 99,8% de especificidade (Bennett *et al.*, 2015). Apesar de específico, sua taxa de sensibilidade ainda é baixa e está atribuída a pacientes que apresentam as características clínicas do transtorno,

mas não é identificado o biomarcador anti-AQP4 (Bennett *et al.*, 2015; Seay; Rucker, 2019).

A fim de incluir os diferentes status sorológico para o biomarcador anti-AQP4, o termo NMO foi adaptado para doenças do “espectro da neuromielite óptica” (ENMO ou NMOSD - do inglês *Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders*), no qual estão inclusos pacientes com ou sem a presença do autoanticorpo, ou com esse status sorológico indefinido. Dessa forma, conforme visualizado na Tabela 1, o diagnóstico de ENMO pode ser determinado de duas formas, a primeira quando é identificada a presença do autoanticorpo anti-AQP4 juntamente com a manifestação de um dos fenótipos clínicos, o que ocorre em aproximadamente 73% dos casos e a segunda quando o paciente apresenta *status* sorológico negativo ou indefinido para o anti-AQP4 no qual são exigidos outros critérios de diagnóstico (Higa, 2022; Sato *et al.*, 2014; Seay; Rucker, 2019; Zarei *et al.*, 2018).

Tabela 1 – Diagnóstico ENMO

AQP4-IgG positivo	AQP4-IgG negativo ou desconhecido
<ul style="list-style-type: none"> • Ao menos uma das manifestações clínicas principais; • Resultado positivo para o teste AQP4-IgG utilizando CBA; • Exclusão de diagnósticos alternativos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ao menos duas manifestações clínicas principais, sendo pelo menos uma: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Neurite óptica aguda; ✓ Mielite aguda com lesão medular em pelo menos três corpos vertebrais consecutivos da medula espinhal; ✓ Síndrome de área postrema. • Resultado negativo para AQP4-IgG (CBA) • Exclusão de diagnósticos alternativos

Fonte: modificado de Frota (2016)

Sendo assim, quando um indivíduo apresenta as manifestações clínicas da ENMO porém não é identificada a presença do anti-AQP4 faz-se necessário uma análise cautelosa da ressonância magnética, visto que algumas lesões cerebrais podem auxiliar na diferenciação entre outras patologias e assim, contribuir para a exclusão de diagnósticos alternativos (Sato *et al.*, 2014).

Contudo, devido à baixa sensibilidade do teste CBA muitos pacientes que apresentam status sorológico negativo para o anti-AQP4 posteriormente são identificados como soropositivos e isso representa uma grande problemática, visto que a presença do autoanticorpo em questão pode possibilitar o diagnóstico precoce da doença e consequentemente prevenir novos surtos (Bennett *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2014; Seay; Rucker, 2019).

Logo, é eminente a importância do desenvolvimento de testes com uma sensibilidade maior, de maneira tal que a precisão e a exatidão dos diagnósticos sejam aperfeiçoadas, possibilitando que o tratamento seja coerente com a necessidade do paciente (Higa *et al.*, 2019; Zarei *et al.*, 2018).

No caso da ENMO, como não existe uma cura, o tratamento é feito à base de corticoides, com o objetivo de minimizar as sequelas, prevenir surtos repentinos e reduzir a mortalidade (Frota; Mendes; Vaconcelos, 2016; Zarei *et al.*, 2018).

As causas da ENMO, ainda são desconhecidas no meio científico, mas como se trata de uma enfermidade onde o próprio sistema imunológico ataca o prolongamento dos astrócitos, são amplamente mencionados os fatores de risco, que podem interferir na manifestação da doença, tais como: a presença de bactérias ativas do tipo *Clostridium perfringens*, que comprometem a BHE; estresse, desregulação dos níveis de Vitamina D e predisposição genética; além dessas características também sabe-se que a ENMO tem se apresentado de maneira mais ativa em mulheres, com idade média entre 32,6 e 45,7 anos (Seay; Rucker, 2018; Zarei *et al.*, 2018).

2.3 NANOTECNOLOGIA

Idealizada pelo físico Richard Feynman, em sua palestra na *American Physical Society* (1959), a nanotecnologia surge a partir da ideia de que os átomos e moléculas podem ser organizados de acordo com as necessidades existentes, de maneira tal que as propriedades físicas, químicas e biológicas daquele determinado material possam ser remanejadas de acordo com aspectos controlados, como tamanho, condutividade, reatividade, entre outros (A. Mazzeo; Santos, 2018).

Todavia, o termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez pelo professor Norio Taniguchi da *Tokyo Science University*, em 1974, a fim de explicar sobre a

elaboração e processamento de materiais precisos em escala nanométrica, ou seja, aqueles entre 1 e 100 nanômetros (Abdussalam-mohammed, 2019).

Sabendo que um nanômetro (nm) é um metro dividido um bilhão de vezes, ou seja, é equivalente a 10^{-9} m (0,000.000.001 metro) a partir dessa década iniciou-se o processo de ascensão das pesquisas direcionadas aos materiais nanoestruturados, bem como o desenvolvimento desses dispositivos, e suas inúmeras aplicações em diversas áreas do conhecimento (A. Mazzeo; Santos, 2018; Abdussalam-mohammed, 2019).

Com seu potencial eminente de satisfazer a demanda industrial em diversos aspectos, a nanotecnologia tem sido amplamente utilizada na engenharia, ciências dos materiais, indústrias químicas, espaciais, cosméticas, entre outras (Syafiuddin *et al.*, 2020). Nesse contexto, a nanotecnologia também tem se apresentado como um novo campo de estudo no que diz respeito a área médica, denominada nanomedicina ou nanobiotecnologia (A. Mazzeo; Santos, 2018).

Com relação à área médica, a nanotecnologia tem possibilitado inúmeros avanços tais como a liberação de fármacos de maneira controlada no organismo do paciente, o tratamento de doenças através da medicina regenerativa que consiste no estímulo ao desenvolvimento do potencial terapêutico advindo do próprio organismo da pessoa, a realização de cirurgias as quais seriam extremamente difíceis em escalas macroscópicas, diagnósticos mais precisos do que os atuais, entre outros (A. Mazzeo; Santos, 2018; Azzawi; Ahmed, 2016).

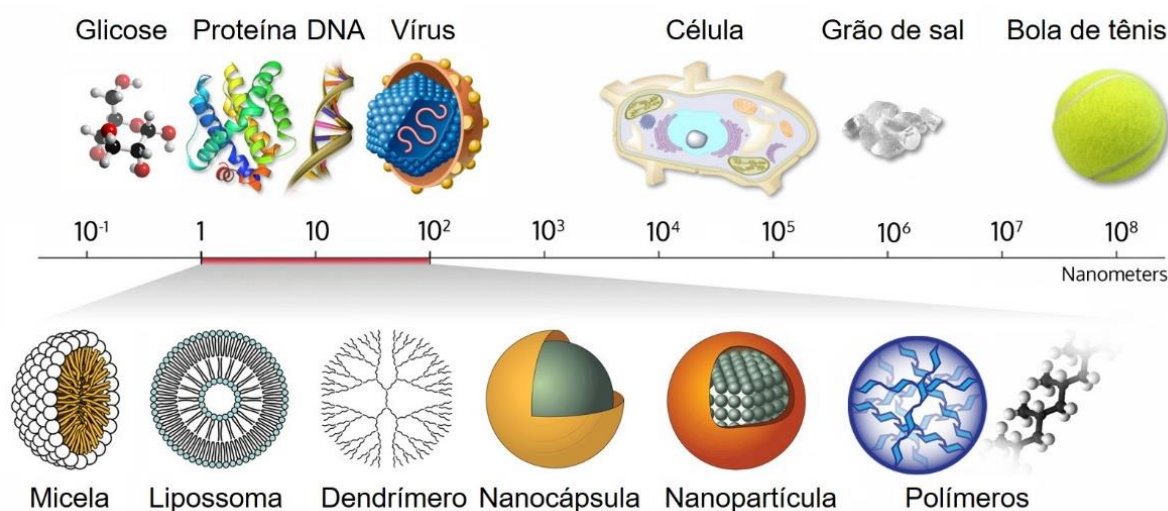
Assim sendo, a nanomedicina tem se apresentado como uma área de inúmeras aplicações, subdividindo-se nos seguintes grupos: diagnósticos, nanoimagens, quimioterapia, nanodispositivos e também na administração controlada de medicamentos (Abdussalam-mohammed, 2019).

2.3.1 Nanopartículas

Dentre os materiais desenvolvidos nos estudos da nanotecnologia, destacam-se as nanopartículas (NPs), definidas como materiais que apresentam tamanho na ordem de 1 a 100 nm, sintetizadas a partir da interação entre átomos e moléculas, remanejadas de acordo com as necessidades pré-estabelecidas (Syafiuddin *et al.*, 2020).

Apesar de muito pequenas, quando comparadas a coisas macroscópicas como um fio de cabelo por exemplo, as NPs possuem uma área de interação relativamente grande em nível molecular, conforme visto na figura 4 onde visualizamos a comparação da escala de tamanho, e devido a essa grande superfície de interação, quando um sólido é reduzido à escala nanométrica, e ocorrem modificações tanto no seu formato quanto no tamanho de suas nanoestruturas, isso repercute em alterações drásticas em suas propriedades físicas, tais como condutividade térmica e elétrica, resistência à oxidação e propriedades ópticas, que são controladas e ajustadas durante o processo sintético de acordo com a aplicação pretendida (Hill; Li, 2017; Khan; Saeed; Khan, 2017; Sharma; Kanchi; Bisetty, 2015).

Figura 4 – Escala de tamanho



Fonte: Traduzido de [Wichlab](#).

As NPs, existentes ou em desenvolvimento, são classificadas de acordo com a matéria-prima utilizada no seu desenvolvimento, esses conjuntos são: materiais não metálicos e inorgânicos, metais e ligas metálicas, nanomateriais à base de carbono, dendrímeros, nanopolímeros e QDs (do inglês *quantum dots*) que basicamente são partículas semicondutoras, tais como o telureto de cádmio (Ponnuchamy; Ramkumar; Pugazhendhi, 2019).

2.3.1.1 Síntese, funcionalização e caracterização de NPs

Para a obtenção (síntese) das NPs podem ser aplicados dois métodos: top-down e bottom-up; o primeiro advém de um processo físico, que consiste na divisão do reagente sólido (em macroescala) até a escala nanométrica. O segundo diz respeito

à construção dessas NPs a partir do remanejamento de átomos ou moléculas, por meio de rotas de síntese química (Hill; Li, 2017; Iravani *et al.*, 2014).

No método físico, é mais comum que seja utilizada a evaporação-condensação ou a ablação à laser, que é um método eficiente para a síntese de NPs, porém demanda alta concentração de reagente, maior tempo de preparo e um alto consumo de energia elétrica. Para a síntese de NPs, o método de redução química é o mais utilizado, para o qual é necessário o uso de agentes redutores, tais como o citrato de sódio, borohidreto de sódio, ácido ascórbico, polietilenoglicol (PEG), entre outros (Beyene *et al.*, 2017).

Para promover a estabilização das NPs em suspensão, há dois métodos mais convencionais: estabilização eletrostática e estérica. O primeiro é obtido através da utilização de reagentes aniônicos que interagem com a superfície das NPs promovendo a formação de uma camada elétrica a qual resulta em uma força de repulsão entre elas, já o segundo é feito por meio da adsorção de moléculas orgânicas ou com hidróxido de amônio, as quais por apresentarem um volume maior impedem a aglomeração entre as nanopartículas em suspensão (Abou El-Nour *et al.*, 2010).

Para a caracterização de NPs, podem ser aplicadas diversas técnicas, entre elas: a microscopia de força atômica (AFM, do inglês *atomic force microscopy*), microscopia eletrônica de transmissão e varredura (MET e MEV, respectivamente) e a espectrofotometria na região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético (UV-Vis), utilizada no presente trabalho. Cada uma dessas técnicas tem a sua funcionalidade específica, por exemplo, a AFM faz medições tridimensionais, que permitem medir a altura e possibilita cálculos de volume e área das partículas, já a espectrofotometria UV-Vis é usada para confirmar a formação das NPs, por meio dos valores de comprimento de onda e absorbância característicos de cada composição (ABOU EL-NOUR *et al.*, 2010).

2.3.1.2 Nanopartículas de prata

Historicamente as NPs metálicas, especialmente de ouro e prata, contribuíram em diversas aplicações, um exemplo disso é o famoso “Lycurgus cup” produzido por volta de 400 d.C. no Império Romano, a partir do vidro dicróico o qual possui NPs de

ouro e prata, garantindo assim variações na sua coloração conforme a incidência de luz (Ilan *et al.*, 2007).

As NPs metálicas, de maneira geral, são amplamente estudadas hoje no que se refere a área médica e possuem como diferencial suas propriedades ópticas que podem ser alteradas conforme o aspecto morfológico, formato, tamanho e eletronegatividade, resultando na diversidade de colorações, que estão associadas à interação dos elétrons livres com a luz, portanto, analisadas a partir das técnicas de espectrofotometria UV-Vis. Os valores encontrados para o comprimento de onda estão intrinsicamente ligados ao formato, tamanho, composição e distribuição das NPs (Khan; Saeed; Khan, 2017; Lee; Jun, 2019).

As nanopartículas de prata (AgNPs), por sua vez apresentam diversas aplicações seja na indústria automobilística, química, cosmética, entre outras, mas nas últimas duas décadas tem se destacado na área médica, principalmente pelo seu potencial antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório, antiviral e antiplaquetário (Beyene *et al.*, 2017; Ponnuchamy; Ramkumar; Pugazhendhi, 2019).

Esse diferencial das AgNPs está associado com diversas características, entre elas o tamanho dessas nanoestruturas que podem variar de 1-10 nm, quanto menor o tamanho maior a área superficial, portanto, se trata de uma característica essencial para obtenção de melhores efeitos catalíticos (Ramesh *et al.*, 2016).

Para aplicações de sensoriamento, as AgNPs com tamanho entre ~50-80 nm apresentam maior eficiência de transdução de sinal, visto que a eficácia no espalhamento de luz na região visível do espectro eletromagnético aumenta nesse intervalo de tamanho, tornando os sinais de deslocamento de bandas mais evidentes (Ivanova *et al.*, 2019).

Dessa forma, com os avanços científicos na compreensão da luz como onda eletromagnética, atrelado aos trabalhos dos físicos James Maxwell e Michael Faraday, percebeu-se empiricamente a dependência de características como tamanho e concentração de partículas com os resultados das colorações apresentadas em uma solução coloidal (Ferreira *et al.*, 2016).

A origem das características ópticas AgNPs está associada a movimentação coletiva dos elétrons livres, pois quando há a incidência de radiação esses elétrons são acelerados e entram em movimento. Essa oscilação promove uma polarização de cargas na superfície da partícula e como resultado disso surge no polo oposto aos

elétrons, uma força restauradora, que busca o retorno ao equilíbrio (Ammari; Deng; Millien, 2016; Lee; Jun, 2019).

Essas oscilações de cargas nas nanopartículas em uma frequência bem definida, são denominadas *plasmons* e são descritas pelo modelo matemático de Drude-Lorentz, o qual determina as respostas elétricas do material analisado considerando o movimento dos elétrons livres na sua superfície (Ammari; Deng; Millien, 2016).

Dessa forma, os elétrons ficam em movimento oscilatório, que acontece em uma frequência específica, chamada ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*) e fornece uma explicação sobre as propriedades ópticas da nanopartícula bem como sua interação com outros materiais (Amendola; Pilot; Frasconi, 2017).

Um resultado dessa SPR nas AgNPs, por exemplo, é a coloração amarelo metálico da suspensão, que possui comprimento de onda dentro do intervalo de 421 a 425 nm, assim sendo, as variações nas tonalidades indicam diferentes estados de agregação (Ramesh *et al.*, 2016).

2.3.1.2.1 Síntese e funcionalização das AgNPs

A síntese química das AgNPs pode ser realizada por diversos métodos, entre eles está o “Método do Citrato”, utilizado no presente trabalho, o qual foi proposto inicialmente por *Turkevich*, a fim de se obter AgNPs esféricas e estáveis, com uma geração mínima de resíduos, de acordo com Gorup e colaboradores a síntese consiste em uma reação de óxido-redução, na qual o citrato de sódio, ao entrar em contato com os íons de prata em solução, cede elétrons para a transformação dos íons Ag^+ em núcleos de prata Ag^0 , então a partir da nucleação desses íons há a formação das nanopartículas, que quando monitoradas a partir da SPR com a técnica de espectrofotometria UV-Vis possuem uma banda plasmônica característica em torno de 425 nm (Alves *et al.*, 2019; Gorup *et al.*, 2011).

Para promover a biocompatibilidade das AgNPs, é necessária a conjugação dessas nanoestruturas com biomoléculas, por exemplo as proteínas, o que corresponde à etapa de funcionalização (Nghiem *et al.*, 2010). Essa etapa divide-se em três tipos principais: química, covalente e de adsorção. A funcionalização química,

está diretamente relacionada com a formação dos grupos funcionais; a funcionalização covalente (*crosslinking*) é a alternativa para nanopartículas com revestimento polimérico e/ou características anfífilas, nas quais são aplicados agentes reticulantes com grupos funcionais específicos que promovem a ligação cruzada entre a nanopartícula e a biomolécula; já a de adsorção é aplicada para biomoléculas carregadas positiva ou negativamente e essas adsorvem às partículas por atração eletrostática, forças de *van der Waals*, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, entre outros (Sperling; Parak, 2010).

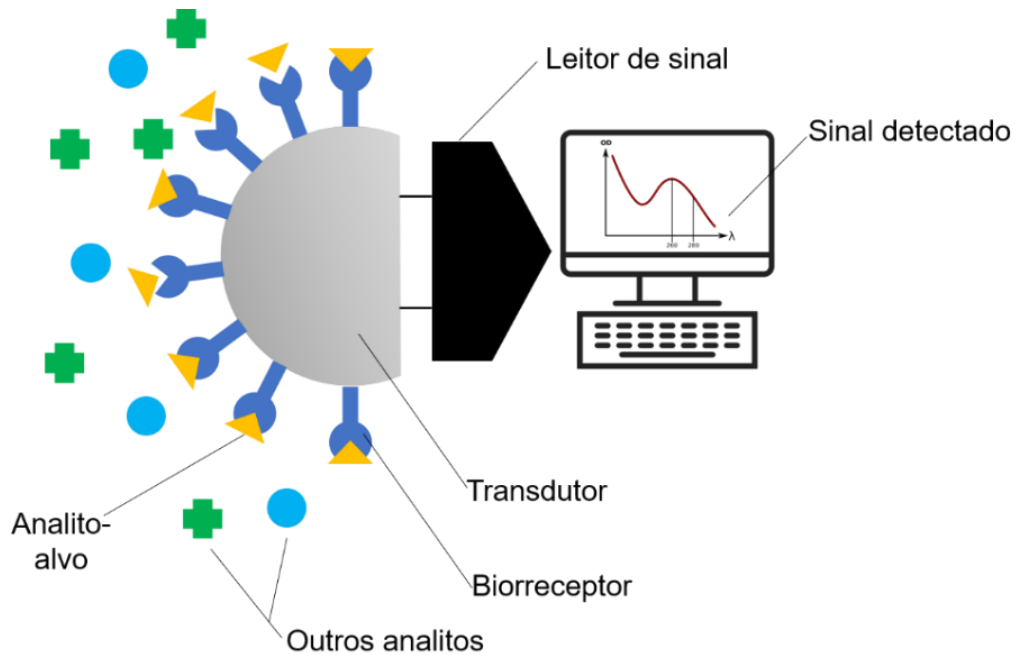
Em suma, as modificações e funcionalização nas AgNPs têm o propósito de adequar suas propriedades físico-químicas, tornando-as funcionais para sensoriamento de interações específicas envolvendo complexos biológicos, como a interação antígeno-anticorpo no caso dos nanoimunossensores, relevante no estudo das imunopatologias já discutidas no presente trabalho (Higa *et al.*, 2019; Nghiem *et al.*, 2010; Sperling; Parak, 2010).

2.3.1.2.2 Nanoimunossensor de AgNPS

Sendo assim, atrelado a todos esses avanços científicos que permitem o controle das propriedades das NPs, e conseqüentemente da sua interação com outros materiais, tem ocorrido também a ascensão da pesquisa na área de nanobiossensores para diagnósticos de doenças, que são dispositivos, em escala nanométrica, capazes de converter um evento biológico em um sinal mensurável, e este pode ser avaliado posteriormente, melhorando significativamente a precisão do diagnóstico. Um subconjunto desses nanobiossensores, sintetizados de maneira mais específica para doenças ligadas ao sistema imunológico, são os nanoimunossensores, que visam detectar interações específicas entre antígenos e anticorpos (Chamorro-garcia; Merkoç, 2016; Higa, 2022).

Nesses sistemas há um biorreceptor específico conjugado a um nanossensor, conforme visualizado na representação da figura 5, o qual possui a finalidade de reconhecer determinadas interações entre o biorreceptor e as biomoléculas-alvo e, quando tal interação intermolecular é detectada, ocorre uma perturbação no sistema coloidal que é convertida em algum sinal mensurável e/ou observável (Dahman, 2017).

Figura 5 – Representação do funcionamento de um nanobiossensor



Fonte: Higa (2022)

No caso dos nanobiossensores ópticos, como as AgNPs desenvolvidas no presente trabalho, ocorrem mudanças nas propriedades ópticas (absorção, reflexão e espalhamento da luz), que podem culminar na alteração da coloração da suspensão coloidal, alteração essa que poderá ser visível à olho nú e quantificada através dos deslocamentos no SPR em direção à região do ultravioleta ou infravermelho do espectro eletromagnético, em razão da dispersão ou aglomeração causadas pelas interações intermoleculares (Chouhan, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Aplicar um nanoimunossensor, feito com nanopartículas de prata, para um estudo sorológico dos pacientes diagnosticados com ENMO.

3.2 ESPECÍFICOS

- i. Sintetizar AgNPs monodispersas e estáveis;
- ii. Aplicar métodos de funcionalização covalente das nanopartículas de prata com um dos epítomos da proteína AQP4, visando o sensoriamento de interações antígeno-anticorpo;
- iii. Promover e otimizar condições de incubação do conjugado nanopartícula-peptídeo com os anticorpos-alvo, o anti-AQP4;
- iv. Caracterizar e descrever as etapas de desenvolvimento do nanoimunossensor (síntese e funcionalização);
- v. Interpretar os dados obtidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A fim de viabilizar este trabalho foram realizadas previamente no projeto FAPESP 2015/05283-6, após aprovação pelo comitê de ética das instituições relacionadas (via Plataforma Brasil, CAAE: 51297215.3.3001.0065), as seguintes etapas:

- Obtenção dos soros de pacientes com doenças do ENMO (8 anti-AQP4 positivos e 8 anti-AQP4 negativos);
- Obtenção dos soros de pacientes com EM e saudáveis (4 EM e 5 saudáveis);
- Purificação das IgGs totais dos soros;
- Síntese de peptídeos relativos à AQP4.

Esses processos foram coordenados pela professora Dra. Doralina G. Brum Souza como parte integrante do projeto desenvolvido na tese de doutorado da sua orientanda Dr. Akemi Martins Higa, participante do grupo GNN que inicialmente co-orientou este trabalho, no qual foram recrutados pacientes no ambulatório de Neuroimunologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, classificados conforme os critérios diagnósticos propostos pelo IPND para as doenças do ENMO.

A partir disso, em parceria com o Dr. Luís A. Peroni, especialista na área de imunologia com ênfase em anticorpos monoclonais e sócio-diretor da Rheabiotech Desenvolvimento, Produção e Comercialização de Produtos de Biotecnologia Ltda; foram aplicados diversos métodos para a identificação dos peptídeos e purificação das amostras de soro; as quais foram enviadas ao GNN, na UFSCar Sorocaba e conservadas sob refrigeração para que este e outros trabalhos de pesquisa fossem desenvolvidos.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Síntese das nanopartículas de prata

Para a síntese das AgNPs, uma solução de 100 mL com concentração de 1,0 mmol/L de nitrato de prata (AgNO_3 , 99%, Labsynth, Diadema, São Paulo) é preparada e aquecida até 90°C. Atingida essa temperatura, uma solução de 1 mL de citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$, 99%, Labsynth, Diadema, São Paulo) com concentração de 0,3 mol/L é adicionada à solução de nitrato de prata, iniciando a reação de óxido-redução. Decorrido aproximadamente 12 min, sob agitação constante à 90°C, a solução apresenta uma coloração amarelo metálico, devido à formação de núcleos Ag^0 que se aglomeram formando as nanopartículas. Observada a mudança de cor, que atesta a formação das AgNPs, é adicionado 1 mL de hidróxido de amônio (28%) à suspensão, como agente moderador e estabilizante da reação. Finalizada a reação, a suspensão então é resfriada à temperatura ambiente e armazenada ao abrigo da luz à 4°C (Gorup *et al.*, 2011).

4.2.2 Funcionalização e incubação com anticorpos

O processo de funcionalização das AgNPs foi realizado com base em um protocolo desenvolvido por Tang e colaboradores (Tang; Dong; Ren, 2010). Basicamente, a primeira etapa da funcionalização consiste na modificação química da superfície das AgNPs com a adição de 350 μL de ácido 11-mercaptoundecanóico com concentração de 0,025 mmol/L (11-MUA, 95% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA), o qual por conter um grupo tiol interage fortemente com a superfície metálica da nanopartícula. A mistura é mantida em reação, sob agitação constante durante 2h.

Após essa etapa, é adicionado à suspensão uma solução composta de dois agentes reticulantes, 325 μL de 0,04 mmol/L de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC \geq 97% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) e 325 μL de 0,3 mmol/L de N-hidroxissuccinimida (NHS 98% Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA), numa reação de 40 min, também sob agitação constante.

Finalizadas as etapas de modificação química da superfície das AgNPs, uma solução do peptídeo sintético da proteína AQP4, cuja concentração foi variada ao longo do desenvolvimento do trabalho, é adicionada à suspensão numa reação de 2h em temperatura ambiente, seguido da incubação à 4°C por 12h. Decorrido este período, a suspensão poderá ser aplicada em análises de interação com anticorpos,

que são promovidas por meio da incubação dessas biomoléculas com as AgNPs funcionalizadas com o peptídeo à 37°C durante 1h.

4.2.3 Caracterização dos processos de síntese e funcionalização das nanopartículas

4.2.3.1 Imageamento por AFM

A caracterização das AgNPs será realizada por meio da aquisição de imagens de AFM em alta resolução, com o intuito de obter dados relacionados ao tamanho (diâmetro) e morfologia das nanopartículas (Heera; Shanmugam, 2015). A AFM é uma das técnicas mais utilizadas para esse propósito, pois fornece essas imagens em três dimensões (Klapetek *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2007). Para isso, será utilizado o modo contato intermitente, "*tapping mode*", para o imageamento da amostra com pontas de AFM compostas de nitreto de silício (constante de mola 1,7 N/m, raio ~10 nm, frequência de ressonância 90kHz e superfície reflexiva de ouro, modelo AN-NSG03, NT-MDT). Para esta análise, 50 µL de AgNPs, diluídas em água Milli-Q, serão depositadas sobre uma superfície de mica com dimensão 15x15 mm² (Ted Pella Inc, Redding, California, USA), previamente clivada e esterilizada por 20 min em equipamento de emissão de luz ultravioleta e ozônio, ProCleaner™ modelo UV.PC.220 Plus (BIOFORCE Nanosciences, Ames, Iowa, USA). Para o cálculo da distribuição de tamanho das nanopartículas, será utilizado o software *ImageJ*, um programa de domínio público destinado ao processamento de imagens, no qual é possível analisar o diâmetro de nanopartículas esféricas.

4.2.3.2 Análise das propriedades ópticas das nanopartículas

Com a técnica de espectrofotometria UV-Vis foram analisados o tamanho, formato e a distribuição de tamanho (dispersão) das nanopartículas sintetizadas e, também, acompanhadas as etapas da funcionalização com o peptídeo e interação deste conjugado com os anticorpos a serem investigados. Dessa forma, as suspensões de AgNPs foram analisadas em um espectrofotômetro *Shimadzu* UV-Vis-

NIR 3600, para análise na região UV-Vis do espectro eletromagnético (300 - 800 nm), com intervalo de leitura de 1 nm.

4.2.4 Obtenção de dados e análise das medidas

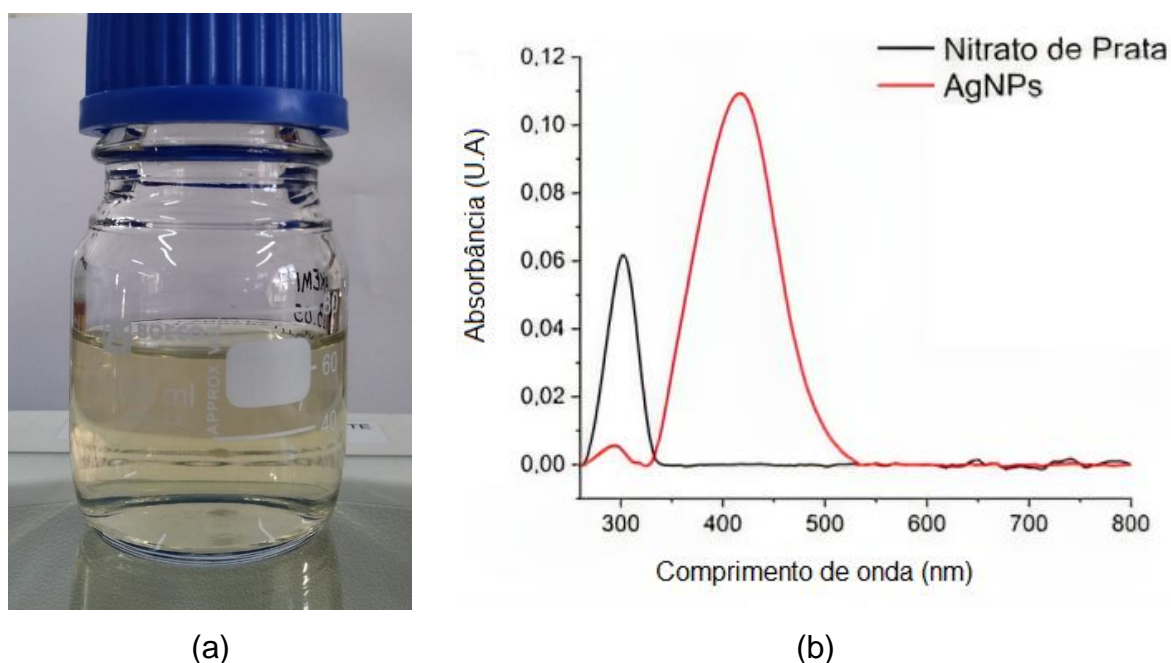
Os dados obtidos foram analisados e tratados com o software *Origin8*, que permite a geração de gráficos, ajuste de linhas de base, gaussianas, dos quais podem ser extraídas informações correspondentes à distribuição de tamanho das AgNPs, deslocamento de bandas no espectro eletromagnético, largura à meia altura de bandas e picos gerados com as técnicas de espectroscopia, que possibilitam o acompanhamento do processo de funcionalização, bem como da análise de ocorrência de interações entre o conjugado e os anticorpos a serem investigados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Inicialmente a formação de AgNPs foi indicada pela alteração visível de cor da suspensão, com estabilização em aproximadamente 12 minutos, de incolor para levemente amarela, conforme visto no frasco na figura 6 (a) e comprovado através da análise do espectro UV-Vis em 6 (b) que em um primeiro momento (linha preta) estava com um pico característico em torno de 300nm e após a síntese estava com λ_{\max} em torno de 417 nm, indicando que os íons de prata foram convertidos em AgNPs.

Figura 6 – Síntese das AgNPs

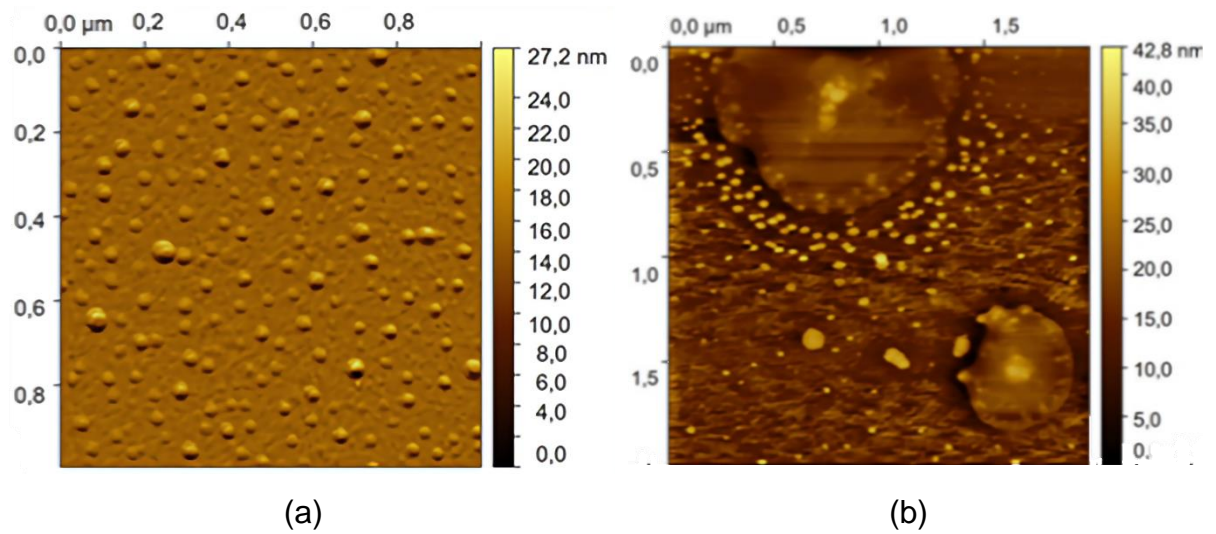


Fonte: Autoria própria

Posteriormente, a fim de visualizarmos a estrutura das AgNPs formadas, através dos métodos descritos na metodologia, bem como confirmar a eficiência da aplicação do método de funcionalização com a proteína AQP4, foram analisadas amostras dessas duas etapas (síntese e funcionalização, respectivamente) no AFM.

Sendo assim, conforme visualizado na figura 7, a síntese (a) resultou em AgNPs com diâmetro médio de 25 ± 6 nm e após a etapa de funcionalização 7(b) é possível observar que, conforme previsto na literatura, houve a aglomeração das AgNPs com a formação de complexos com diâmetro médio de 35 ± 15 nm, caracterizando uma suspensão polidispersa.

Figura 7 – AgNPs após síntese e funcionalização



Fonte: Autoria própria

Com a etapa de síntese e funcionalização já bem definidas e apresentando resultados consistentes com a literatura, temos que os dois primeiros objetivos específicos do trabalho foram alcançados. Dessa forma, iniciaram-se os passos seguintes para promover e otimizar as técnicas de incubação das AgNPs com um dos epítomos da proteína anti-AQP4 e sua posterior interação com AQP4-IgG.

5.2 INTERAÇÃO COM ANTICORPO

Conforme descrito na seção 2.1.1, no presente trabalho a técnica de incubação das AgNPs, se concentrou em uma única porção da proteína AQP4, o epítipo AQP4₆₁₋₇₀, a escolha deste epítipo em específico para o desenvolvimento do nanoimunossensor se deve a um estudo anterior, realizado pelo nosso grupo de pesquisa em nanoneurobiofísica (GNN) do qual por intermédio das técnicas de imobilização com sondas nanométricas e análises no AFM os autores identificaram que este é o epítipo mais reativo aos anticorpos AQP4-IgG em amostras de pacientes ENMO soropositivos (Higa *et al.*, 2019; Moraes *et al.*, 2019).

5.2.1 Pacientes soropositivos pelo CBA

Com o nanoimunossensor construído, o primeiro passo foi testar sua reação ao interagir com o soro de oito pacientes, enumerados de 1 a 8, identificados como

soropositivos pelo teste CBA, ou seja, aqueles que já tínhamos a certeza que possuíam o AQP4-IgG em sua composição e todos eles, com a concentração padrão de 56 µg/mL, tiveram seus resultados reafirmados pelo nanoimunossensor desenvolvido, com uma alteração evidente na coloração de todas as suspensões, quando comparadas ao primeiro frasco de referência com as AgNPs dispersas, conforme visualizado na figura 8.

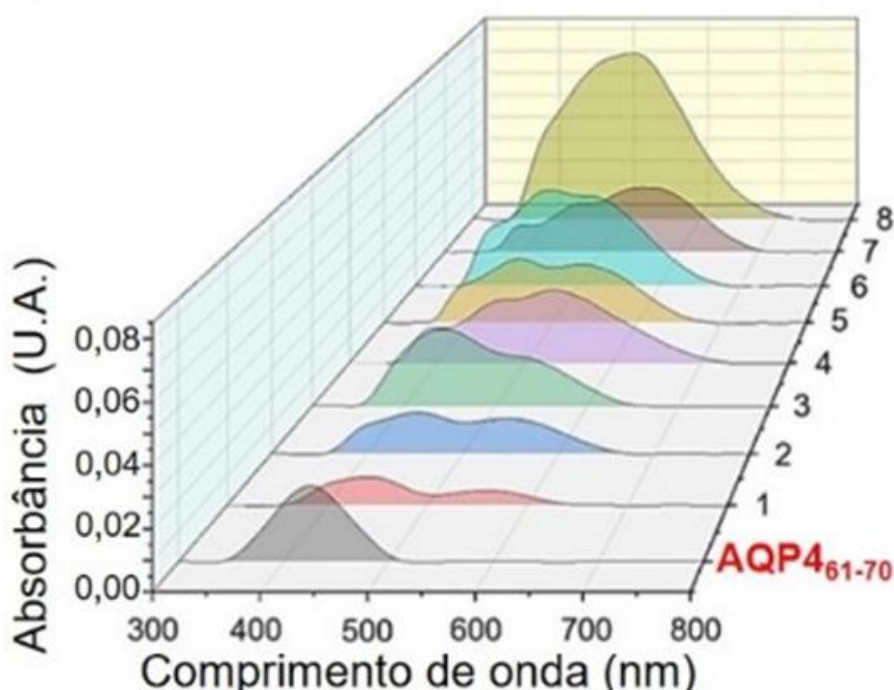
Figura 8 – Pacientes soropositivos para o autoanticorpo AQP4-IgG



Fonte: Adaptado de Higa (2022)

Na figura 9 é possível observar os espectros de absorção no espectrofotômetro UV-Vis dessas amostras, e confirmar a sua agregação com o aparecimento de uma nova banda na região de maior comprimento de onda e deslocamento do pico principal, quando comparado ao frasco de referência em primeiro plano, com as AgNPs monodispersas, conforme previsto pela literatura.

Figura 9 – Espectros de absorção dos pacientes classificados como soropositivos para o autoanticorpo AQP4-IgG pelo CBA



Fonte: Autoria própria

Analisando os dados obtidos, dos pacientes 1 a 8, foi possível constatar que após a interação com as soluções de IgGs das amostras de soro, incubadas por 60 min, houve o deslocamento médio ($\Delta\lambda$) de 37,7 nm e comprimento de onda máximo (λ_{max}) de 424 nm. Além da formação de uma nova banda e deslocamento do pico principal foi observado também uma banda mais larga entre 500 e 600 nm no espectro eletromagnético, e a formação de um novo pico em ~360 nm.

5.2.2 Pacientes com ENMO soronegativos pelo CBA

Com os resultados promissores obtidos até então, um segundo grupo de pacientes foi analisado, os quais foram enumerados de 9 a 16, essas pessoas foram diagnosticadas com ENMO a partir de suas manifestações clínicas, entretanto com o teste CBA não foi constatado a presença do autoanticorpo característico da doença.

O grande diferencial alcançado pelo presente trabalho, conforme resumido na tabela 2, é que utilizando o nanoimunossensor de AgNPs conjugado ao epítipo AQP4₆₁₋₇₀ foi possível obtermos um resultado melhor que o ensaio convencional utilizado no mundo todo e identificar a presença do anti-AQP4 no paciente 14 com concentração padrão de 56 $\mu\text{g/mL}$ e, além disso, quando essa concentração da solução de IgGs totais foi aumentada para 100 $\mu\text{g/mL}$ foi possível também comprovar a presença do AQP4-IgG em outros três pacientes (9,10 e 11), o que indica que pode existir uma relação com a concentração.

Tabela 2 - Resposta do Nanobiossensor com epítipo AQP4₆₁₋₇₀ ao soro dos pacientes classificados como soronegativos pelo teste CBA

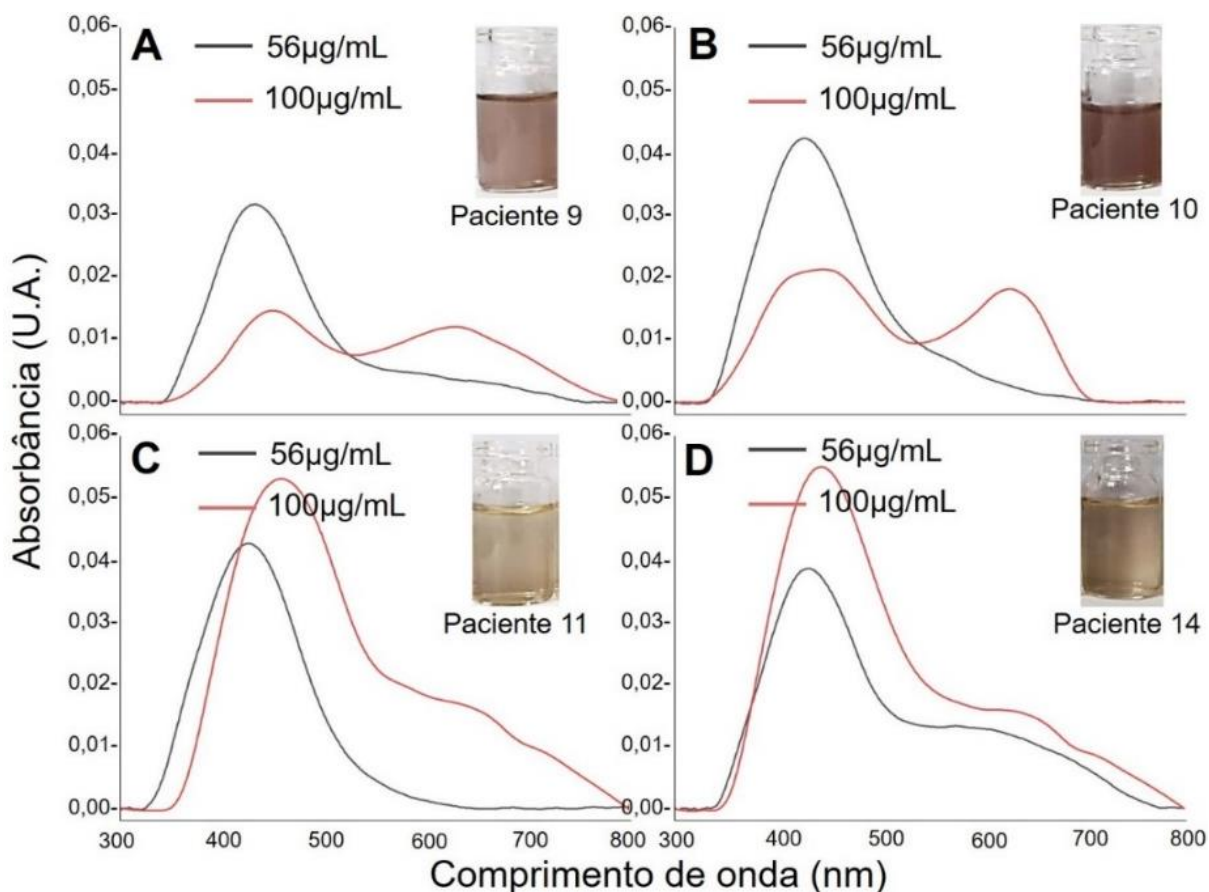
Pacientes	Nanobiossensores AgNPs-AQP4 ₆₁₋₇₀	
	C= 56 $\mu\text{g/mL}$	C= 100 $\mu\text{g/mL}$
9	-	+
10	-	+
11	-	+
12	-	-
13	-	-
14	+	+
15	-	-
16	-	-

Fonte: Autoria própria

Na figura 10 é possível observarmos os resultados desses 4 pacientes, que tiveram o status sorológico positivado pelo nanoimunossensor, com a alteração da cor

da suspensão indicando maior agregação das AgNPs, bem como a formação do segundo pico, que no caso do paciente 14 (d) foi possível observar em ambas as concentrações.

Figura 10 – Pacientes soronegativos pelo CBA-AQP4, positivos com as AgNPs



Fonte: Autoria própria

O fato de o anticorpo ter sido detectado na concentração padrão de 56 µg/mL em apenas um dos pacientes, mas ter sido identificado na concentração de 100 µg/mL em outros três, sugere que a falha na detecção do anticorpo, do teste CBA, pode estar associada ao limite de detecção do método ou à reatividade dos anticorpos presentes nas amostras desses pacientes.

Porém, é importante salientar que apesar de ser um critério que possibilitou a detecção nesses pacientes a concentração não é o único deles, visto que no estudo realizado e publicado pelo grupo de pesquisa foi perceptível também uma dependência do epítipo da proteína que foi utilizada (Moraes *et al.*, 2019).

5.2.3 Pacientes saudáveis ou com EM

A fim de também averiguar se o nanobiossensor desenvolvido não estava gerando falsos-positivos, foram feitos testes a partir de amostras de soro de indivíduos com EM (enumerados de 17 a 20), os quais como já sabemos não possuem o biomarcador da ENMO e saudáveis (enumerados de 21 a 25), conforme visualizado na figura 11.

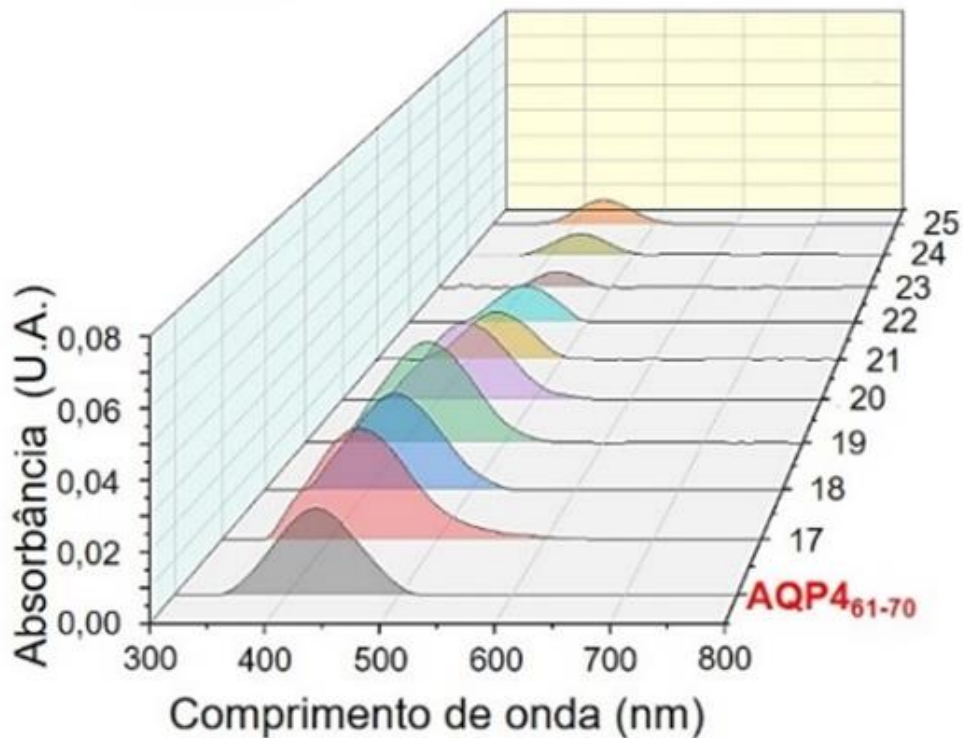
Figura 11 – Pacientes com EM (17-20) e saudáveis (21-25)



Fonte: Adaptado de Higa (2022).

Visualmente é possível detectar uma leve diferença na coloração da suspensão dos pacientes 23 e 24 (saudáveis) porém, além da variação ser muito pequena quando comparada àquelas obtidas em pacientes soropositivos; conforme vemos na figura 12 os espectros de absorção no espectrofotômetro UV-Vis dessas amostras também apresentaram uma única banda, não indicando a formação de um novo pico como no caso dos pacientes em que foi constatada a presença do anticorpo.

Figura 12 – Espectros de absorção dos pacientes com EM e saudáveis



Fonte: Autoria própria

Dessa forma, conclui-se que o nanobiossensor desenvolvido com o epítipo o AQP4₆₁₋₇₀, produziu dois resultados que visualmente poderiam ser considerados como falsos-positivos, mas que através da análise no UV-Vis não indicaram aglomeração das AgNPs; visto que a ausência do anticorpo que interage com a AQP4 faz com que elas permaneçam dispersas, resultando apenas no aumento do índice de refração sem alterações significativas no espectro UV-Vis. De acordo com Higa (2022) já que o padrão do espectro de absorção apresentou somente uma banda, eles não comprometeram a conclusão final.

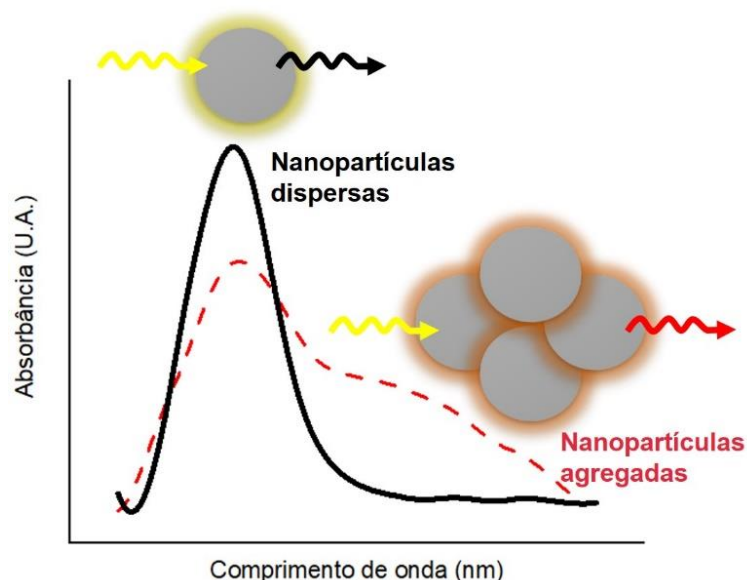
5.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados mostraram que o nanobiossensor desenvolvido a partir de AgNPs conjugadas ao epítipo AQP4₆₁₋₇₀, detectou o biomarcador característico nas amostras dos pacientes ENMO soropositivos, com a apresentação dos resultados clara a olho nu e confirmação através da análise do espectro de absorção e ainda identificou a presença do AQP4-IgG em outros 4 pacientes identificados pelo CBA como soronegativos.

No que diz respeito aos pacientes sem o biomarcador da doença, saudáveis e EM, dois resultados apresentaram uma variação leve da coloração (inexpressivas quando comparadas aos soropositivos, que apresentaram uma mudança intensa) mas, conforme o esperado, não indicaram a agregação das AgNPs na análise do espectro UV-Vis.

Visto que, conforme discutido nos tópicos de revisão da literatura, a detecção da interação entre o conjugado AgNP-AQP4₆₁₋₇₀ e o autoanticorpo é realizada através da observação das bandas presentes no espectro UV-Vis. Essas transformações espectrais, associadas às mudanças de cor na suspensão, resultam do aumento do espalhamento de luz e do acoplamento dos plasmons de superfície entre as nanopartículas agregadas, conforme visualizado na figura 13, onde em preto está representado o espectro de absorção no UV-Vis de nanopartículas dispersas, já visto na figura 7(a), apresentando um único pico de absorção. Em vermelho tracejado, o espectro UV-Vis resultante da agregação de nanopartículas, visto na figura 7(b), refletida pelo aumento do espalhamento de luz em região de maior comprimento de onda (Evanoff; Chumanov, 2005).

Figura 13 – Espectro de absorção no UV-Vis da agregação das AgNPs

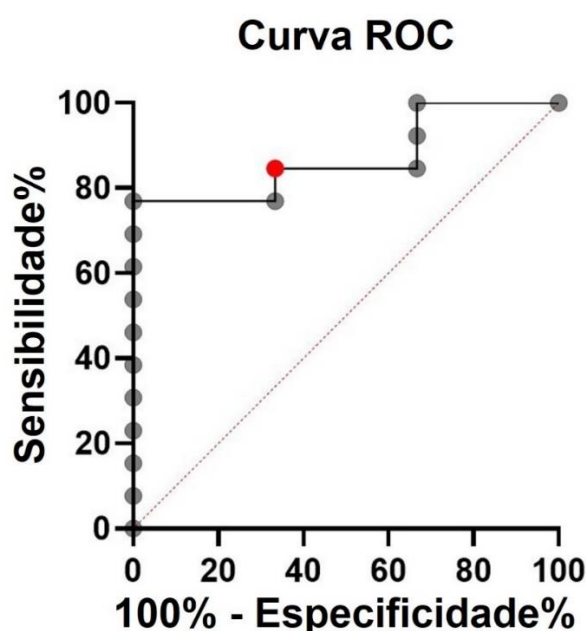


Fonte: Higa (2022).

Dessa forma, a fim de averiguar avaliar qual especificidade e sensibilidade do nanobiossensor desenvolvido foi aplicado a curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) sobre os resultados dos 16 paciente com ENMO analisados, que basicamente é uma representação gráfica para avaliar o desempenho de um sistema.

O foco do presente trabalho foi direcionado para o aumento da sensibilidade de detecção já que o ensaio convencional apresenta uma boa especificidade de 99,8%, mas com índice de sensibilidade em 76,5%. Sendo assim, de acordo com a curva ROC apresentada na figura 14 o nanobiossensor desenvolvido neste estudo apresentou nível de especificidade de 66,67% e de sensibilidade em 84,2%.

Figura 14 - Curva ROC mostrando o ponto de corte (ponto vermelho) para a qual os valores de sensibilidade e especificidade são 84,62% e 66,67%, respectivamente



Fonte: Higa, Moraes, Shimizu et al. (2022)

Indicando um resultado promissor, o qual se for mais desenvolvido em estudos futuros pode resultar na simplificação e antecipação do diagnóstico de pacientes com ENMO no mundo, o que conseqüentemente pode prevenir surtos, antecipar o tratamento e prolongar a vida de diversas pessoas.

5.4 PUBLICAÇÃO

Os resultados do trabalho desenvolvido foram publicados na Revista Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine da Science Direct: Higa AM, Moraes AS, Shimizu FM, Bueno RG, Peroni LA, Strixino FT, Sousa NAC, Deffune E, Bovolato ALC, Oliveira ON Jr, Brum DG, Leite FL. Anti-aquaporin-4 immunoglobulin G colorimetric detection by silver nanoparticles. Nanomedicine. 2022 Apr;41:102531. doi: 10.1016/j.nano.2022.102531. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35114406.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o objetivo geral do presente trabalho foi alcançado através da aplicação de um nanoimunossensor, feito com nanopartículas de prata, para um estudo sorológico dos pacientes diagnosticados com ENMO. Através da aplicação dos métodos descritos na literatura também foi possível alcançar com êxito os objetivos específicos de sintetizar AgNPs monodispersas e estáveis, aplicar métodos de funcionalização e ainda promover e otimizar condições de incubação do conjugado nanopartícula-peptídeo com os anticorpos-alvo e com isso desenvolver um nanoimunossensor com índice de sensibilidade de 84,2%, ou seja, maior do que o utilizado até o momento no teste convencional (CBA).

Em conjunto com os trabalhos desenvolvidos e publicados pelo grupo de pesquisa em nanoneurobiofísica (GNN) é possível constatar que há muitos desafios remanescentes que estimulam a necessidade de futuros projetos para que esse método seja aperfeiçoado, otimizando seu índice de especificidade, bem como outros fatores que ainda carecem de informações no que diz respeito ao estudo do ENMO. Todavia através da publicação em uma revista internacional com bom fator de impacto, estão mais próximos da comunidade científica mundial, indicando que em um futuro próximo poderão ser aderidos na prática clínica para a detecção da doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. MAZZEO; SANTOS, Enrico Jardim Clemente. Nanotechnology and multipotent adult progenitor cells in Reparative Medicine: therapeutic perspectives. **Einstein**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 1–6, 2018.

ABBAS, Abul K; LICHTNAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Básica Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico Shiv Pillai , MBBS , PhD**. [S. l.]: Saunders Elsevier, 2014.

ABDUSSALAM-MOHAMMED, Wanisa. Short Review Article Review of Therapeutic Applications of Nanotechnology in Medicine Field and its Side Effects. [s. l.], v. 1, n. 3, p. 243–251, 2019.

ABOU EL-NOUR, Kholoud M.M. *et al.* Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 135–140, 2010.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210000377>.

ALVES, Tiago *et al.* Ecotoxicology and Environmental Safety Silver nanoparticles : An integrated view of green synthesis methods , transformation in the environment , and toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 171, n. May 2018, p. 691–700, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.095>.

AMENDOLA, Vincenzo; PILOT, Roberto; FRASCONI, Marco. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles : a review. [s. l.], 2017.

AMMARI, Habib; DENG, Youjun; MILLIEN, Pierre. Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles and Applications in Imaging. [s. l.], v. 220, p. 109–153, 2016.

ATKINS, Gregory J *et al.* Introduction: the biological basis. [s. l.], 2012.

AZZAWI, May; AHMED, Waqar. Nanotechnology for the diagnosis and treatment of diseases. [s. l.], v. 11, p. 2025–2027, 2016.

BENNETT, Jeffrey L *et al.* International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. [s. l.], v. 0, 2015.

BEYENE, Hayelom Dargo *et al.* Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. **Sustainable Materials and Technologies**, [s. l.], v. 13, p. 18–23, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214993717300106>.

CHAMORRO-GARCIA, Alejandro; MERKOC, Arben. Nanobiosensors in diagnostics. [s. l.], v. 3, p. 1–26, 2016.

CHOUHAN, Neelu. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. *In: SILVER NANOPARTICLES - FABRICATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS*. [S. l.]: InTech, 2018. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/silver-nanoparticles-fabrication-characterization-and-applications/silver-nanoparticles-synthesis-characterization-and-applications>.

COBO-CALVO, Alvaro; VUKUSIC, Sandra; MARIGNIER, Romain. Clinical spectrum of central nervous system myelin oligodendrocyte glycoprotein autoimmunity in adults. [s. l.], p. 459–466, 2019.

DAHMAN, Yaser. **Nanosensors - an overview | ScienceDirect Topics**. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemical->

engineering/nanosensors.

DENDROU, Calliope A; FUGGER, Lars; FRIESE, Manuel A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Publishing Group**, [s. l.], n. August, 2015.

EVANOFF, David D.; CHUMANOV, George. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. **ChemPhysChem**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 1221–1231, 2005.

FERREIRA, Sílvia. Aquaporinas. **Revista de Ciência Elementar**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 6–8, 2014.

FERREIRA, Jacqueline *et al.* RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE LOCALIZADO E APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES E CÉLULAS SOLARES. **Química Nova**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 1098–1111, 2016.

FROTA, Elizabeth Regina Comini; MENDES, Maria Fernanda; VACONCELOS, Cláudia Cristina Ferreira. **Recomendações no tratamento da esclerose múltipla e neuromielite óptica**. 2ªed. São Paulo: [s. n.], 2016.

GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI, Vanessa Pereira; DINIZ, Luan. Glia: Dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avancados**, [s. l.], v. 27, n. 77, p. 61–84, 2013.

GONDIM, Francisco de Assis Aquino; THOMAS, Florian P; GRAÇA, José Ronaldo Vasconcelos. **Lesões medulares clínicas e experimentais**. Fortaleza: [s. n.], 2016.

GORUP, Luiz F. *et al.* Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 360, n. 2, p. 355–358, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.04.099>.

HEERA, P; SHANMUGAM, S. Nanoparticle Characterization and Application: An Overview. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 379–386, 2015. Disponível em: <http://www.ijcmas.com>.

HIGA, Akemi M *et al.* Peptide-Conjugated Silver Nanoparticle for Autoantibody Recognition. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 7564–7573, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31196262>.

HIGA, Akemi Martins. **Sensoriamento óptico do anticorpo AQP4-IgG utilizando nanobiossensores de nanopartículas de prata associados com**

epítopos da proteína AQP4 São Paulo Sensoriamento óptico do anticorpo AQP4-IgG utilizando nanobiossensores de nanopartículas de prata associad.

2022. 139 f. - Universidade de São Paulo, [s. l.], 2022.

HIGA, Akemi Martins. Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata Aplicadas à Detecção de Imunoglobulinas G Autorreativas. [s. l.], 2017.

HILL, Emily K.; LI, Julang. Current and future prospects for nanotechnology in animal production. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–13, 2017.

IAN, Freestone *et al.* The Lycurgus Cup- A Roman Nanotechnology. [s. l.], 2007.

IRAVANI, S *et al.* Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 385–406, 2014.

IVANOVA, Nadezhda *et al.* Silver Nanoparticles as Multi-Functional Drug Delivery Systems. *In: NANOMEDICINES*. [S. l.]: IntechOpen, 2019.

KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid; KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], 2017.

KLAPETEK, Petr *et al.* Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 6, p. 1–9, 2011.

LEE, Sang Hun; JUN, Bong-hyun. Silver Nanoparticles : Synthesis and Application for Nanomedicine. [s. l.], 2019.

LENNON, Prof Vanda A. *et al.* A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. **Lancet**, [s. l.], v. 364, n. 9451, p. 2106–2112, 2004.

LENNON, Vanda A. *et al.* IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 202, n. 4, p. 473–477, 2005.

LÜDERS, Katja A *et al.* Maintenance of high proteolipid protein level in adult central nervous system myelin is required to preserve the integrity of myelin and axons. [s. l.], n. September 2018, p. 634–649, 2019.

MORAES, Ariana De Souza *et al.* A highly specific and sensitive nanoimmunosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders. **scientific reports naturereaseach**, [s. l.], p. 1–9, 2019.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: [s. n.], 2014.

NESVEROVA, Veronika; TÖRNROTH-HORSEFIELD, Susanna. Phosphorylation-Dependent Regulation of Mammalian Aquaporins. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 82, 2019.

NGHIEM, Thi Ha Lien *et al.* Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 025009, 2010. Disponível em: <http://stacks.iop.org/2043-6262/1/i=2/a=025009?key=crossref.86ad4343cc5808e439f5b858e4e5bab3>. Acesso em: 2 abr. 2019.

PAPADOPOULOS, Marios C.; VERKMAN, Alan S. Aquaporin water channels in the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience** 2013 14:4, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 265–277, 2013.

PONNUCHAMY, Kumar; RAMKUMAR, Vijayan Sri; PUGAZHENDHI, Arivalagan. Synthesis of Silver Nanoparticles. [s. l.], p. 2650–2660, 2019.

PRASAD, Sashank; CHEN, John. What you need to know about aqp4, mog, and nmosd. **Seminars in Neurology**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 718–731, 2019.

RAMESH, Suhas *et al.* Peptides conjugated to silver nanoparticles in biomedicine - a "value-added" phenomenon. **Biomaterials science**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 1713–1725, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27748772>. Acesso em: 1 abr. 2019.

RAO, A. *et al.* Characterization of nanoparticles using atomic force microscopy. **Journal of Physics: Conference Series**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 971–976, 2007.

RIEDHAMMER, Christine; WEISSERT, Robert. **Antigen presentation, autoantigens, and immune regulation in multiple sclerosis and other autoimmune diseases**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2015.

ROJAS, Hugo; RITTER, Cristiane. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo : ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. [s. l.], v. 55, n. 48, p. 222–227, 2011.

ROMEIRO, R R *et al.* O papel da Aquaporina-4 no Edema Cerebral. **Revista Neurociências**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 220–224, 2006.

RUSSI, Abigail E; BROWN, Melissa A. The meninges: new therapeutic targets for multiple sclerosis. **Translational Research**, [s. l.], v. 165, n. 2, p. 255–269, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.08.005>.

SATO, Douglas Kazutoshi *et al.* Seronegative Neuromyelitis Optica Spectrum - The challenges on disease definition and pathogenesis. [s. l.], n. February, p. 445–450, 2014.

SEAY, Meagan; RUCKER, Janet C. Neuromyelitis Optica : Review and Utility of Testing Aquaporin-4 Antibody in Typical Optic Neuritis. [s. l.], v. 7, n. 4, p. 229–234, 2018.

SEAY, Meagan; RUCKER, Janet C. Neuromyelitis Optica: Review and Utility of Testing Aquaporin-4 Antibody in Typical Optic Neuritis. **Asia-Pacific Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 229–234, 2019. Disponível em: https://journals.lww.com/apjoo/Fulltext/2018/07000/Neuromyelitis_Optica__Review_and_Utility_of.3.aspx. Acesso em: 28 mar. 2020.

SHAHMOHAMMADI, Sareh; DOOSTI, Rozita; SHAHMOHAMMADI, Abootorab. Autoimmune diseases associated with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders : A literature review. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, [s. l.], v. 27, n. November 2018, p. 350–363, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.11.008>.

SHARMA, Deepali; KANCHI, Suvardhan; BISETTY, Krishna. Biogenic synthesis of nanoparticles : A review. **ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY**, [s. l.], n. November, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.002>.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. 7. ed. [S. l.]: Artmed, 2017.

SPERLING, R. A.; PARAK, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal Inorganic nanoparticles. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [s. l.], v. 368, n. 1915, p. 1333–1383, 2010.

SYAFIUDDIN, Achmad *et al.* Silver nanoparticles adsorption by the synthetic and natural adsorbent materials : an exclusive review. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, [s. l.], v. 3, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s41204-019-0065-3>.

TAKESHITA, Yukio *et al.* Effects of neuromyelitis optica – IgG at the blood –

brain barrier in vitro. [s. l.], v. 0, p. 1–12, 2016.

TANG, Lichuan; DONG, Chaoqing; REN, Jicun. Highly sensitive homogenous immunoassay of cancer biomarker using silver nanoparticles enhanced fluorescence correlation spectroscopy. **Talanta**, [s. l.], v. 81, n. 4–5, p. 1560–1567, 2010.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010001840?via%3Dihub>.

YEO, Eugenia Li Ling *et al.* Understanding aggregation-based assays: Nature of protein corona and number of epitopes on antigen matters. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 20, p. 14982–14993, 2015. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1039/C4RA12089B>.

ZAREI, Sara *et al.* Comprehensive review of neuromyelitis optica and clinical characteristics of neuromyelitis optica patients in Puerto Rico. [s. l.], 2018.

ZHANG, Lu; TIAN, Jing-yuan; LI, Bin. Current immunotherapies for multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders : the similarities and differences. [s. l.], 2019.