

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

“DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR
DESCARTÁVEL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA
DOENÇA DE ALZHEIMER”

Camila Regina Erbereli*

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

E657d Erbereli, Camila Regina
Desenvolvimento de um imunossensor descartável
para o diagnóstico precoce da doença de Alzheimer /
Camila Regina Erbereli. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
47 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Doença de Alzheimer. 2. Imunossensor. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Camila Regina Erbereli, realizada em 23/02/2016:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
UFSCar

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Embrapa

Prof. Dr. Marcelo Firmino de Oliveira
FFCLRP/USP

DEDICATÓRIA

Ao meu amado avô, vítima do Alzheimer, Sr. Lino
Erberelli (in memoriam), pelo grandioso exemplo
de humildade, inteligência e bondade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida. Por ser meu guia e minha fortaleza.

À minha linda mãe, pelo amor, apoio, incentivo, compreensão, dedicação, esforço e por sempre se doar e confiar em mim.

À toda família Erbereli, pelo apoio, pelo carinho e por acreditarem em mim.

À minha comunidade da igreja Santo Antônio, pelas incessantes orações.

Ao Prof^o. Dr. Ronaldo Censi Faria pela orientação, paciência, equilíbrio e conhecimentos compartilhados.

Aos membros da banca, Prof^o. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso e ao Prof^o. Dr. Marcelo Firmino de Oliveira pela disponibilidade, e principalmente pelas relevantes contribuições fornecidas ao trabalho.

À Prof^a. Dra. Marcia Regina Cominetti e a doutoranda Patrícia Regina Manzine do departamento de gerontologia pela disponibilidade e constante auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

À Prof^a. Dra. Ivani Aparecida Carlos pelas agradáveis conversas e aprendizagens.

À minha querida amiga doutoranda Tássia Oliveira, pelos ensinamentos, amizade e companheirismo.

Aos integrantes do LABiE e GQA, pelo convívio diário e trocas de experiências.

À minha linda amiga Bianca, pelo carinho, paciência, risadas e fundamental ajuda.

Aos meus amigos Anderson, Andreza, Guilherme, Jonas, Maria Gabriela e Thais, pela fiel amizade e por estarem sempre ao meu lado.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho fosse concluído com êxito.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab – Anticorpo

Ab1 – Anticorpo monoclonal Anti-ADAM10

Ab2 – Anticorpo policlonal Anti-ADAM10

Ab2-PM-HRP – Bioconjugado composto por Anticorpo policlonal Anti-ADAM10, Partícula Magnética e Peroxidase de Raiz Forte

Ab* – Anticorpo conjugado com a enzima

ADAM – Do inglês: *A disintegrin and metalloprotease*

Ag – Antígeno

AgAb – Complexo antígeno-anticorpo

Ag* – Antígeno conjugado com a enzima

APP – Do inglês: *Amyloid Precursor Protein*

AuNP – Nanopartícula de Ouro

AuNPs-GHS – Nanopartícula de Ouro modificada com Glutathione

AVC – Acidente Vascular Cerebral

A β – β -amilóide

BSA – Albumina de Soro Bovino

CCL – Comprometimento Cognitivo Leve

CSF – Fluido Cerebroespinal

DA – Doença de Alzheimer

DCNTs – Doenças Crônicas Não Transmissíveis

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

ELISA – Do inglês: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GHS – Glutationa

HQ – Hidroquinona

HRP – Peroxidase de raiz forte

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

K_A – Constante de Afinidade

LABEN – Laboratório de Biologia do Envelhecimento

LbL – *Layer by Layer*

LOD – Limite de Detecção

MES – Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico

NHS – Hidroxisuccinimida

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão Fosfato Salina

PBS-T – Tampão Fosfato Salina + Tween-20 0,05%

PDDA – cloreto de poli(dialildimetil-amônio)

PM – Partícula Magnética

pTau181 – Proteína Tau fosforilada

TFT – Taxa de Fecundidade Total

t-Tau – Total-Tau

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1 - Comparação entre cérebros de pacientes saudáveis e afetados pela DA. Em cérebros com DA observa-se aumento dos ventrículos e diminuição do córtex.	4
FIGURA 1. 2 - Diferentes classes de imunossensores obtidos através do método de ELISA (do inglês: Enzyme-linked immunosorbent assay).....	9
FIGURA 1. 3 - Representação de uma separação imunomagnética. (A) Amostra contendo analito, PMs já modificadas em meio a diversos interferentes (B) PMs com o analito capturado sendo atraídas pelo ímã, resultando em uma separação magnética (C) Retirada do sobrenadante contendo os interferentes.....	11
FIGURA 1. 4 - Sistema microfluídico composto pela bomba de seringa, injetor manual conectado à célula microfluídica.....	14
FIGURA 3. 1 - Representação esquemática da fabricação dos eletrodos: 1) Folha de transparência; 2) Transferência do adesivo de vinil recortado para folha de transparência; 3) Serigrafia da tinta de carbono e pintura da tinta de Ag/AgCl no eletrodo de referência e 4) Retirada do adesivo vinílico.....	19
FIGURA 3. 2 - Montagem da célula microfluídica: 1) Arranjo de eletrodos de trabalho e auxiliar na folha de transparência, 2) colagem do adesivo dupla face; 3) inserção do eletrodo de referência e 4) célula microfluídica montada.	20
FIGURA 3. 3 - Procedimentos para a lavagem das PMs (A) PMs diluídas em tampão MES 0,05 mol L ⁻¹ pH 5,2 (B) Separação magnética por meio de um suporte com ímã (C) Retirada do sobrenadante.....	23
FIGURA 3. 4 - Sistema microfluídico, consistindo da bomba de seringa, injetor manual e célula microfluídica.	25

FIGURA 4. 1 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ e KCl 0,5 mol L ⁻¹ (A) Repetitividade do arranjo com 8 eletrodos; (B) Reprodutibilidade entre quatro diferentes arranjos.....	30
FIGURA 4. 2 - (A) Voltamogramas cíclicos obtido em solução de ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ e KCl 0,5 mol L ⁻¹ dos eletrodos de trabalho sem modificação em diferentes velocidades de varredura (B) Relação logarítmica entre a corrente de pico anódico e a velocidade de varredura de potenciais em solução ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ e KCl 0,5 mol L ⁻¹	31
FIGURA 4. 3 - Variação da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura do mesmo eletrodo sem modificação.	32
FIGURA 4. 4 - (A) Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de trabalho modificado com PDDA e AuNPs-GSH em diferentes velocidades de varredura, (B) Relação logarítmica entre a corrente de pico anódico e a velocidade de varredura de potenciais para os mesmos eletrodos de trabalho modificados com PDDA e AuNPs-GSH em solução ferroceno monocarboxílico 1 mmol L ⁻¹ e KCl 0,5 mol L ⁻¹	33
FIGURA 4. 5 - Variação da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais dos mesmos eletrodos de trabalho modificados com PDDA e AuNPs-GSH.	34
FIGURA 4. 6 - (A) Sinais transientes de corrente obtidos para o biomarcador ADAM10 0,555 pg mL ⁻¹ em diferentes tempos de incubação com injeção de uma solução de H ₂ O ₂ e HQ. Potencial aplicado: -0,2 V. (B) Média das correntes de pico provenientes da ADAM10 variando o tempo de incubação em 10, 20 e 30 minutos do complexo no eletrodo.	36
FIGURA 4. 7 - Diagrama das reações envolvidas no mecanismo de resposta do imunossensor proposto, sendo HRPox a peroxidase oxidada e HRPred a peroxidase reduzida.	37

- FIGURA 4. 8 - (A) Sinais transientes de corrente obtidos para o biomarcador ADAM10 $0,555 \text{ pg mL}^{-1}$ em diferentes vazões da solução carreadora com injeção de uma mistura de H_2O_2 e HQ. Tempo de incubação de 30 min e potencial aplicado: $-0,2 \text{ V}$. (B) Média das correntes de pico provenientes da ADAM10 ao variar a vazão da solução carreadora em $50, 100$ e $200 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$38
- FIGURA 4. 9 - Curva analítica obtida em soro de bezerro. (A) Variação da corrente em função concentração do biomarcador ADAM10 e (B) Sinais transientes de corrente.....39
- FIGURA 4. 10 - Comparação entre os resultados obtidos pelo método de ELISA e o imunossensor descartável, provenientes das concentrações da proteína ADAM10 em amostras de plasma de idosos. Idosos (A) sadios e (B) portadores da DA.....41
- FIGURA 4. 11 – Comparação dos resultados obtidos com ELISA e com o imunossensor descartável em amostras de plasma de idosos cognitivamente saudáveis (controle) e idosos com doença de Alzheimer (DA), em diferentes estágios da doença, identificados como CDR 1 (DA leve), CDR 2 (DA moderada) e CDR 3 (DA grave)..42

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR DESCARTÁVEL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA DE ALZHEIMER

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de um imunossensor para a determinação de um biomarcador proteico, contido no sangue periférico, no caso a ADAM10, pertencente à família das ADAMs (*A disintegrin and metalloprotease*), a fim de diagnosticar precocemente a doença de Alzheimer (DA) e verificar a progressão do quadro demencial. As ADAM10 são proteínas α -secretases envolvidas na clivagem da proteína precursora do amilóide, que possuem correlação com a DA. Para isto, foram desenvolvidas células eletroquímicas descartáveis baseadas em um arranjo de eletrodos de carbono obtidos por meio da técnica de serigrafia, que posteriormente foram acoplados a um sistema microfluídico, a fim de diminuir o tempo de análise, e reduzir o consumo de amostra na detecção do biomarcador. Para tanto, anticorpos monoclonais específicos para o analito foram imobilizados a partir de ligações covalentes sobre a superfície dos eletrodos já modificados. Essa modificação consistiu na deposição do polímero cloreto de poli(dialildimetil-amônio) seguida de uma camada de nanopartículas de ouro por meio da técnica *layer-by-layer*. Além disso, fez-se uso de partículas magnéticas (PMs) decoradas com marcadores eletroquímicos e anticorpos específicos para captura dos biomarcadores nas amostras sintéticas e reais. Por fim, os eletrodos foram expostos ao bioconjugado formado pelo analito ligado as PMs, e assim realizada a etapa de detecção, que consistiu na resposta eletroquímica dada pelo marcador enzimático presente na PM. Como resultado observou-se boa reprodutibilidade e repetitividade entre os eletrodos descartáveis construídos. Parâmetros tais como tempo de captura do biomarcador no eletrodo e vazão da solução carreadora foram avaliados, a fim de garantir uma melhor

eficiência do imunossensor desenvolvido. O tempo de 30 minutos foi estabelecido como o mais eficiente para a captura do biomarcador, enquanto a vazão foi de $100 \mu\text{L min}^{-1}$. Uma vez obtidas as melhores condições a curva analítica, foi desenvolvida em soro de bezerro, obtendo-se um limite de detecção de $5,56 \text{ fg mL}^{-1}$, sensibilidade de $1,47 \text{ nA mL fg [ADAM10]}^{-1}$ e intervalo linear de $5,56 \text{ fg mL}^{-1}$ a $1,389 \text{ pg mL}^{-1}$. O sistema desenvolvido foi aplicado na detecção de ADAM10 presente em amostras reais de idosos saudáveis e portadores da DA, obtendo um resultado bastante satisfatório quando comparado àquele obtido pelo método ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). O método proposto permitiu avaliar a expressão da doença nos pacientes idosos bem como a progressão da mesma, sendo que para pacientes controle foi obtida uma menor concentração de ADAM10 quando comparada as concentrações encontradas nos diferentes estágios da DA. Desta forma, o método desenvolvido pode trazer contribuições relevantes para um diagnóstico preciso e precoce da DA.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A DISPOSABLE IMMUNOSENSOR FOR EARLY DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

The objective of this project is the developing of an immunosensor for detection of a protein biomarker contained in peripheral blood, in this case the ADAM10, that belong to the family of ADAM (A disintegrin and metalloprotease) in order to early diagnosis of Alzheimer's disease (AD) and check the progression of the dementia. The ADAM10 are α -secretase proteins that are involved in the cleavage of the amyloid precursor protein, which has correlation with AD. For this, disposable electrochemical cell based on an array of carbon electrodes was developed using screen-printing technique, which was subsequently coupled to a microfluidic system, in order to reduce the time for analysis as well as the sample consumption for the biomarker detection. In this way, specific monoclonal antibodies for ADAM10 were immobilized from covalent bonds on the surface of the modified electrodes. The electrode was modified by deposition of a polymer followed by a layer of gold nanoparticles by Layer-by-Layer technique. In addition, magnetic particles (MPs) was used decorated with electrochemical markers and specific antibodies for capture of biomarkers in synthetic and real samples. Finally, the electrodes were exposed to the bioconjugate formed by the analyte bounded to MPs following by the detection step, which consisted of the electrochemical response of the enzyme marker present in the MP. As a result, good reproducibility and repeatability among the disposable electrodes were obtained. Parameters such as biomarker capture time and flow rate of the carrier solution was evaluated, in order to ensure the best response for the developed immunosensor. The time of 30 minutes was established as the most efficient for capturing the biomarker, while the flow rate was $100 \mu\text{L min}^{-1}$. Once define the best conditions, the analytical curve

was developed in calf serum, getting a detection limit of 5.56 fg mL^{-1} , a sensibility of $1.47 \text{ nA mL fg [ADAM10]}^{-1}$ and linear range of 5.56 fg mL^{-1} on $1,389 \text{ pg mL}^{-1}$. The developed system was applied to the detection of ADAM10 present in real samples of healthy elderly and holders of AD, getting a satisfactory result when compared to that obtained by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). The proposed method allows to evaluate the expression and progression of the disease in elderly patients. For control patients, it was obtained a lower concentration of ADAM10 when compared to concentrations found in the different stages of AD. Thus, the developed method can bring relevant contributions to an accurate and early diagnosis of AD.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.2 Doença de Alzheimer	3
1.3 Biomarcadores para DA	6
1.4 Biossensores e Imunossensores	7
1.5 Eletrodos Impressos Descartáveis	12
2. OBJETIVO.....	16
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	17
3.1 Reagentes e soluções	17
3.2 Fabricação e construção da célula microfluídica	18
3.3 Síntese de nanopartículas de Ouro (AuNPs) modificadas com Glutathione (GHS)	20
3.4 Construção de filmes <i>Layer by Layer</i> (LbL) de AuNPs e cloreto de poli(dialildimetil-amônio) (PDDA) e imobilização do Ab1 sobre o eletrodo de carbono	21
3.5 Preparo do bioconjugado composto por Ab2, PMs e enzimas HRP (Ab2-PM-HRP).....	22
3.6 Captura do biomarcador ADAM10 com Ab2-PM-HRP.....	24
3.7 Etapas envolvidas no Sistema Microfluídico desenvolvido.....	24
3.8 Medidas Eletroquímicas	26
3.9 Amostras reais de plasma de idosos controle e idosos com diagnóstico de Alzheimer.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Estudo da repetitividade e reprodutibilidade do arranjo de eletrodos.....	29
4.2 Estudo da influência da velocidade de varredura na resposta eletroquímica em meio de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ em solução de KCl 0,5 mol L ⁻¹	30

4.3 Imobilização covalente do anticorpo anti-ADAM10 sobre os eletrodos modificados e caracterização do sistema microfluídico.	35
4.4 Curva analítica	39
4.5 Determinação de ADAM10 em Amostras Reais de Plasma de Pacientes	40
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento populacional e suas consequências

O envelhecimento é um processo biológico inerente e irreversível a todo ser humano. A Organização Mundial de Saúde (OMS) dispõe sobre o conceito cronológico de velhice como sendo idosa a pessoa com 65 anos ou mais em países desenvolvidos e, nos países em desenvolvimento, é considerado idosa a pessoa com 60 anos ou mais.¹ Assim, no Brasil esta definição está pautada pela Lei nº 8.842, de 4 de janeiro de 1994² e pelo Estatuto do Idoso, Lei nº 10.741, de 01 de outubro de 2003.³

A população mundial idosa está crescendo em ritmo acelerado. É estimado que em 2050, o número de pessoas com mais de 60 anos ultrapasse 2 bilhões, sendo que em 2011 esse número era de aproximadamente 800 milhões.⁴ Entre os anos de 1960 e 1975, a proporção de idosos cresceu de 3 milhões para 7 milhões.⁵ No ano de 1991, essa população passou a ser de 10,7 milhões de pessoas. Já, entre 2009 e 2011, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) constatou 1,8 milhões de idosos a mais.⁶

Concomitantemente a esse rápido envelhecimento da população brasileira está o aumento da expectativa de vida. Segundo a Síntese de Indicadores Sociais de 2014, a expectativa de vida no ano 2000, era de 69,8 anos. Já em 2013, essa idade passa a ser de 74,8.⁷ Esse mesmo documento ainda trata como fatores para o aumento da população idosa brasileira a Taxa de Fecundidade Total (TFT) e

a taxa de mortalidade. O primeiro, ao calcular a média do número de filhos ao fim do período fértil de uma mulher no Brasil, apresentou 2,39 filhos/mulher no ano 2000 em detrimento de 1,77 filhos/mulher em 2013. O segundo, ao calcular a razão da quantidade de mortes de crianças de até um ano de vida e a quantidade de nascidos vivos apresentou 15,0 mortes/1000 nascidos vivos no ano de 2013, sendo que, no ano 2000, a razão apresentada era de 29,0 mortes/1000 nascidos vivos.⁸

Em paralelo à ascendência da expectativa de vida, dados os fatores aqui elencados, dentre outros, há a necessidade de atenção especializada para esse público, uma vez que o envelhecimento traz consigo um leque de doenças e incapacidades comuns à pessoa idosa, como as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs) que levam a limitações funcionais e podem perdurar por um longo período de tempo.⁵ As DCNTs ganham maior expressão sendo responsáveis por mais de 70% dos óbitos entre os idosos no Brasil.⁸ Entre elas, se destacam câncer, diabetes, doenças neuropsiquiátricas, doenças cardiovasculares e enfermidades respiratórias crônicas, apresentando desde instantes de melhora ou piora notáveis até fases críticas, o que determina perda da qualidade de vida e aumento da demanda por serviços de saúde.^{9,10}

Causadas pelas DCNTs, a demência é responsável pela perda significativa de memórias e outros transtornos neuropsicológicos.¹¹ Segundo SANTOS e RIFIOTIS (2003)¹² ao passo que aumenta a idade, aumenta o predomínio de demência do indivíduo.¹² Estima-se que de 2 a 10 % dos casos de demência inicia-se antes dos 65 anos e, após essa idade, o domínio da doença é duplicado a cada cinco anos. A nível global calcula-se que 44 milhões de pessoas vivam com demência e que esse número pode duplicar até o ano de 2030 e triplicar até 2050.^{13,14}

No Brasil, prevê-se um crescimento no número de idosos demenciados de 7,6% em 2010 para 7,9% em 2020, equivalente a 55.000 novos casos a cada ano.¹⁴ Para classificar suas disfunções e transtornos, as demências foram divididas em dois grupos: não-degenerativas e degenerativas. O primeiro é oriundo de traumatismos, tumores, deficiências nutricionais, acidentes vasculares, infecções e diversas outras patologias. Já o segundo, ocorre principalmente nas regiões subcortical e cortical. Esta é responsável pela Doença de Alzheimer (DA).¹⁴

1.2 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA), caracterizada pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907, é uma patologia neurodegenerativa progressiva e irreversível que acarreta perda da memória além de distúrbios cognitivos.¹⁵ A DA é caracterizada por um sucessivo declínio da memória, do raciocínio, da compreensão, da capacidade de realizar cálculos, da linguagem, da capacidade de aprendizagem e de julgamento que acabam por impedir o doente de realizar, sem auxílio, as suas atividades diárias.¹⁶

Diante de todos os quadros de síndromes demenciais conhecidas, a DA é a causa de mais da metade deles, podendo atingir até 80% dos casos, tendo como principais alvos idosos com idade acima de 65 anos.¹⁷⁻¹⁹ Alterações no raciocínio e aprendizado podem ocorrer como parte do processo fisiológico do envelhecimento, ou como sintomas de doenças neurológicas e sistêmicas, ou, ainda, como sintomas predominantes nas síndromes demenciais. A incidência de DA aumenta com a idade e, devido ao aumento tanto da população quanto da expectativa de vida, a prevalência da doença aumenta continuamente em todo o mundo. Em decorrência

do envelhecimento populacional nos países desenvolvidos bem como nos países em desenvolvimento, é esperado um aumento progressivo desses transtornos. Neste cenário, a DA tem um importante impacto social e econômico na saúde pública no mundo e especialmente em nosso país.²⁰

A DA afeta 18 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente com início a partir dos 65 anos,²¹ atingindo 1% da população idosa mundial com essa idade e alcançando 20% dessa população com idade a partir dos 85 anos.²²

Já no Brasil, dentre os casos mais frequentes de demência, 54 % deles são a DA,²² em que há 1,2 milhão de casos, sendo metade deles ainda sem diagnóstico.²³ A DA pode ser diagnosticada em três fases: DA pré-clínica, sendo restrita a pesquisas, Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) devido à DA e a fase de demência.²⁴

O cérebro de um paciente terminal com DA apresenta uma atrofia generalizada devido a alterações patológicas (Figura 1.1).

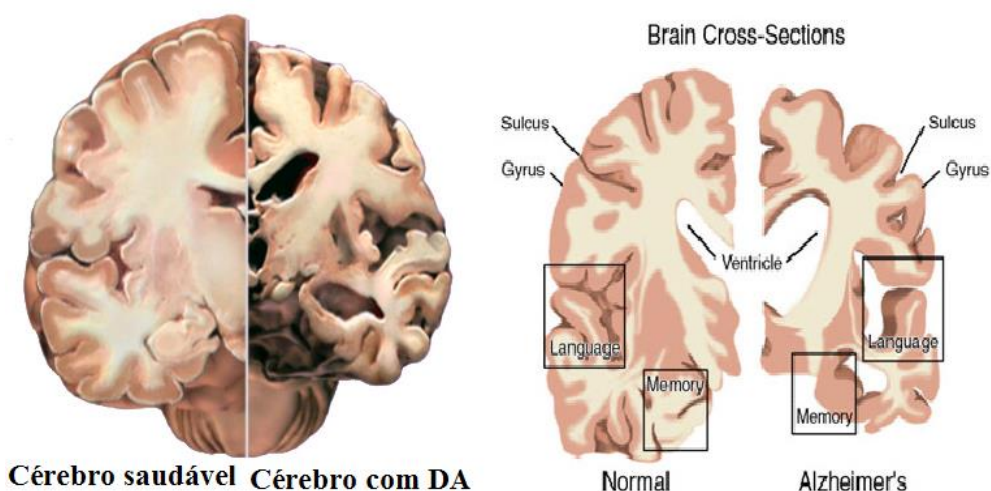


FIGURA 1. 1 - Comparação entre cérebros de pacientes saudáveis e afetados pela DA. Em cérebros com DA observa-se aumento dos ventrículos e diminuição do córtex.²⁵

A origem dessa atrofia é devida a aglomeração de placas amilóides também chamadas de placas senis que são compostas por segmentos da proteína β -amilóide ($A\beta$) agrupados e emaranhados neurofibrilares, formados a partir da proteína Tau. A DA caracteriza-se também pela degeneração dos neurônios e consequentes perdas de memórias recentes, bem como motivação para atividades diárias.²⁶ Para a doença, utilizam-se medicamentos que aliviam os sintomas, uma vez que não há cura para a mesma. Porém, estes recursos não são capazes de impedir a progressão da doença, tendo em vista que os maiores danos cerebrais acontecem antes da fase de demência, caracterizada pelo declínio das funções entendimento e aprendizado.²⁷ Além disso, o diagnóstico preciso dessa patologia só pode ser dado após a morte do paciente, na autópsia.¹⁵ Assim, um melhor resultado é esperado quando o tratamento da doença é iniciado em fases mais precoces, o que é um grande desafio, pois o diagnóstico se dá basicamente por sintomas da doença que geralmente são percebidos em estágios mais avançados.¹⁸ Uma das dificuldades para o diagnóstico da DA é o fato de existirem outras doenças que levam à demência, assim como o acidente vascular cerebral (AVC), a demência de corpos de Lewy e demência frontotemporal.

Desta forma, grandes esforços estão sendo dispendidos na busca por biomarcadores que permitam o diagnóstico preciso da doença bem como o estágio na qual ela se encontra. A detecção da doença em estágios iniciais é fundamental para permitir um melhor controle da doença, diminuindo os custos do tratamento e melhorando a qualidade de vida do paciente.

1.3 Biomarcadores para DA

Os biomarcadores estabelecidos para DA incluem o total-Tau (t-Tau), Tau fosforilada (pTau181) e moléculas de A β .²⁸ No entanto, estes biomarcadores são encontrados somente no fluido cerebrospinal (CSF) e apesar de segura e bem aceita, a coleta de amostra de CSF é invasiva e de custo elevado, além de não ser largamente utilizada em análises clínicas²⁹. Desta forma, outros biomarcadores que possam ser detectados em fluidos corpóreos periféricos são de grande interesse atualmente. Neste sentido, o plasma é um fluido de fácil acesso quando comparado ao CSF e que pode ser coletado com o mínimo de desconforto para o paciente.

Biomarcadores que possam ser detectados no plasma são, portanto, de grande interesse e há uma busca por novos biomarcadores.^{30,31} Estudos recentes, demonstram que a proteína ADAM10, pertencente à família das ADAMs (do inglês: *A disintegrin and metalloprotease*) que são proteínas α -secretases envolvidas na clivagem da proteína precursora do β A (APP do inglês: *Amyloid Precursor Protein*), possuem correlação com a DA.³⁰ Em torno de 19 genes foram detectados em humanos que codificam para ADAMs.²⁹ A ADAM10 consiste em aproximadamente 750 aminoácidos sendo uma protease de membrana e esta envolvida em processos como desenvolvimento embrionário, adesão celular, câncer e DA.³² Ela é a principal α -secretase em células mais afetadas na DA, segundo estudos recentes que estavam em busca de determinar a identidade da α -protease.^{30,33,34} Assim, foi realizado o estudo da expressão gênica da ADAM10 em sangue circulante para verificar a progressão de quadros demenciais, bem como assessorar terapias regradas na inibição de α -secretases e β -secretases, os quais apresentaram importantes resultados na área clínica para o diagnóstico de DA.³⁵

1.4 Biossensores e Imunossensores

Para a detecção de um agente infeccioso (ou agente patogênico), os biossensores apresentam tamanha confiabilidade na área de analítica que estão classificados entre os quatro mais visados como ferramenta de análise.³⁶

Por definição, os biossensores são dispositivos que utilizam espécies biológicas imobilizadas a transdutores apropriados. Essas espécies biológicas, que são responsáveis pelo analito, e podem ser enzimas, antígenos, anticorpos, tecidos animal ou vegetal, organelas, ácidos nucleicos, algumas proteínas, são detectadas pelo sensor, e então, este sinal biológico é convertido a um sinal elétrico pelo transdutor, proporcional a concentração do analito.³⁷⁻³⁹ As vantagens oferecidas pelos biossensores são muitas, e entre elas estão elevada sensibilidade, seletividade, compatíveis com equipamentos portáteis e capacidade em analisar fluidos complexos.^{37,39} São divididos em quatro classes (ópticos, térmicos, eletroquímicos e sensíveis à variação de massa), variando a forma com que o analito é reconhecido. Ao citar a classe dos biossensores eletroquímicos, estes podem ser classificados como potenciométricos, amperométricos e condutométricos.³⁷

Quando um biossensor é baseado na interação entre um anticorpo (Ab) e um antígeno (Ag), este é denominado imunossensor. Essa reação imunológica e específica é capaz de formar um complexo, conforme a equação 1, de forma a garantir alta seletividade, podendo ser caracterizada por meio da constante de afinidade (K_A), conforme a equação 2, em que são consideradas as concentrações no equilíbrio do antígeno livre (Ag), dos sítios livres do anticorpo e do complexo formado (AgAb).³⁸

Os anticorpos fazem parte de uma classe de proteínas e são gerados pelos animais como forma de defesa às substâncias anormais presentes no organismo denominadas antígenos. Neste caso, um anticorpo adequado se ligará ao seu antígeno correspondente.^{38,40}



$$K_A = \frac{[\text{AgAb}]}{[\text{Ab}][\text{Ag}]} \quad (2)$$

Assim, os imunossensores são divididos em classes, como visto na Figura 1.2. Uma delas é classificada como imunossensores competitivos, e consistem na interação do anticorpo com o antígeno livre e em competição com o antígeno marcado (Ag^*). Para essa marcação, usualmente, faz-se uso de uma enzima redox, que funcionará como um marcador eletroquímico, e a formação do complexo acontece devido ao produto da reação enzima-substrato.³⁸ Através de sucessivas lavagens é retirado o excesso de reagentes, e a concentração de antígeno livre será inversamente proporcional à grandeza da medida eletroquímica.

Dentro da classe dos imunossensores competitivos, existe também aqueles que são obtidos através da conjugação de uma enzima redox com o anticorpo (Ab^*), sendo chamados de imunossensores competitivos indiretos. Neste caso, o anticorpo secundário recebe a função de marcador do anticorpo primário que por sua vez reagirá com o antígeno de interesse.³⁸

A outra classe é denominada imunossensores do tipo sanduíche, em que o analito possui elevada massa molecular, e é realizado através da imobilização do anticorpo em uma superfície sólida que está conectada a um transdutor.⁴¹ Ao introduzir a amostra, o antígeno contido nela se ligará a esse anticorpo. Após ocorrer essa interação, um segundo anticorpo conjugado a uma enzima é

adicionado, que novamente será utilizada a reação enzimática para o monitoramento a reação antígeno-anticorpo. O transdutor recebe a função de detectar as mudanças químicas ou físicas ocorridas na camada sensora, causadas pelas interações antígeno/anticorpo, e transformá-las em um sinal mensurável. O método sanduíche utiliza de um tempo curto de reação quando comparado ao método competitivo, além de proporcionar alta sensibilidade e alta especificidade. E toda essa configuração se dá através do reconhecimento simultâneo de distintos sítios de ligações do analito.³⁸

Para um imunossensor eletroquímico do tipo sanduíche são empregados dois anticorpos, sendo um deles o geralmente monoclonal e o outro o policlonal. O primeiro, recebe a função de anticorpo de detecção, devido ao fato de reconhecer um único epítipo do antígeno, enquanto o outro chamado de policlonal, também conhecido como anticorpo de detecção, por sua vez, reconhece vários sítios de ligação do antígeno, ou seja, pode se ligar a mais de um epítipo.

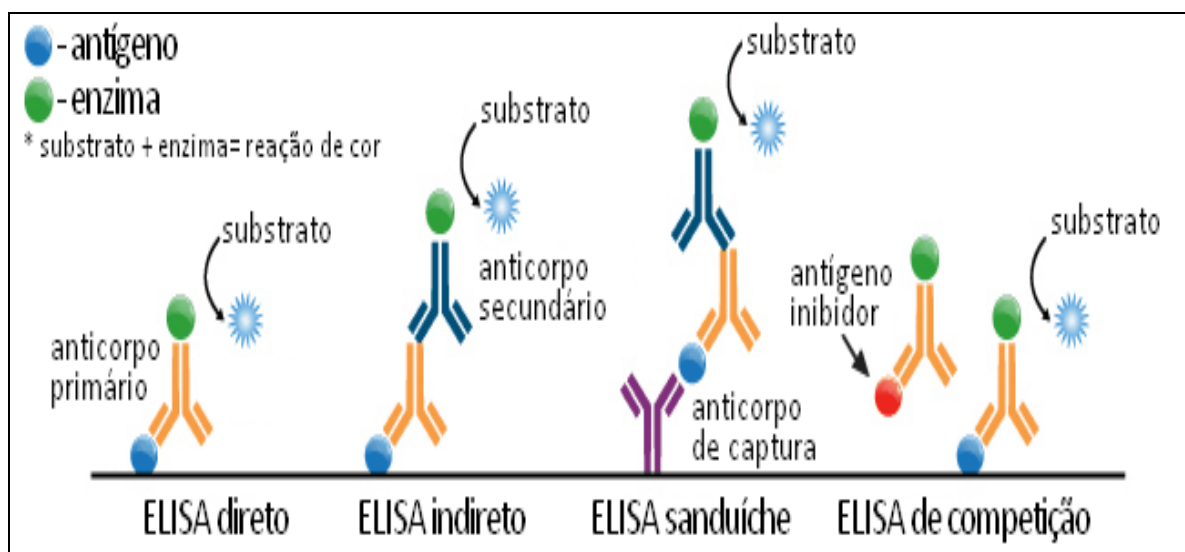


FIGURA 1. 2 - Diferentes classes de imunossensores obtidos através do método de ELISA (do inglês: Enzyme-linked immunosorbent assay).⁴²

Diversas técnicas são capazes de monitorar as interações imunológicas, por exemplo, Wester Blotting e ELISA, sendo a última amplamente utilizada na detecção de proteínas, e pode chegar, eventualmente, a limites de detecção equivalentes a $1,0 \text{ pg mL}^{-1}$.⁴³ Além disso é considerada como técnica padrão para a detecção de biomarcadores para a DA.⁴⁰ Contudo, a técnica traz algumas limitações e, dentre elas, podemos citar: custo relativamente alto do equipamento, longo tempo de análise, elevada quantidade de amostra, além de exigir treinamento para o manuseio. Os imunossensores, por sua vez, possibilitam um menor consumo de amostra, além de menor tempo de análise e a capacidade de desenvolver sistemas portáteis.⁴³

Porém, ao fazer uso de uma superfície sólida para a detecção referente ao sinal da interação antígeno/anticorpo, a construção de imunossensores torna-se limitada, com relativa redução da transferência eletrônica, devido ao bloqueio da camada sensora, causado pelas moléculas de anticorpos que se ligam bio-especificamente, e inviabilizam sua capacidade de reutilização, além de provocar possível diminuição do sinal analítico.⁴⁴⁻⁴⁶ Frente a esse fato, partículas magnéticas (PMs) são utilizadas, a fim de minimizar esse bloqueio, e causar um aumento de transferência eletrônica, que, por consequência, amplificará o sinal analítico de detecção, uma vez que estas PMs são eficazes na separação dos complexos de bioreconhecimento.⁴⁷

Por definição, as PMs são esferas maciças, constituídas de material magnético como maguemita (Fe_2O_3) ou magnetita (Fe_3O_4),⁴⁸ ou partículas *core-shell* recobertas com metais como Au^{49,50} ou Ag.⁵¹ Devido as propriedades magnéticas, essas partículas são modificadas com anticorpos, e usadas como substrato em uma separação imunomagnética (Figura 1.3), o que contribui no aumento da sensibilidade, devido a possibilidade de pré-concentração do analito em

amostras diluídas, além de separação e eliminação de interferentes em meio a amostras complexas, como o sangue, por exemplo.

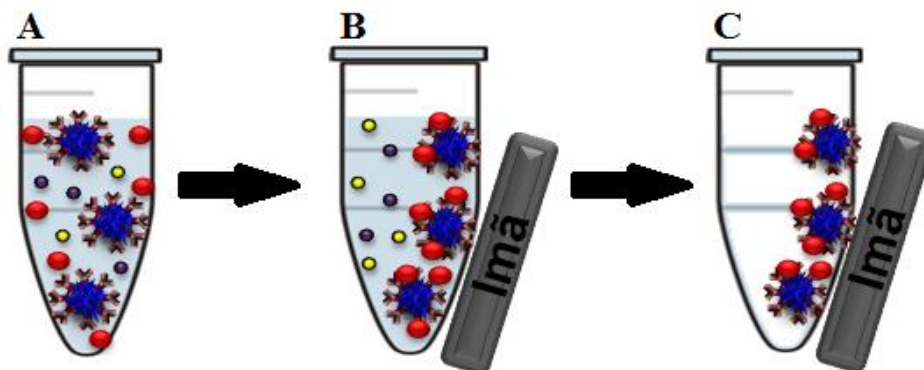


FIGURA 1. 3 - Representação de uma separação imunomagnética. (A) Amostra contendo analito, PMs já modificadas em meio a diversos interferentes (B) PMs com o analito capturado sendo atraídas pelo ímã, resultando em uma separação magnética (C) Retirada do sobrenadante contendo os interferentes.

Assim, por meio da utilização das PMs, uma vez que elas estão em suspensão com o biomarcador de interesse, o desempenho do imunossensor torna-se mais eficaz, pois há um aumento significativo na interação entre antígeno e anticorpo, além de uma amplificação no sinal, devido ao aumento do número de marcadores eletroquímicos. O monitoramento dessa interação é estudado por meio de técnicas eletroquímicas, com o objetivo de diagnosticar precocemente doenças de maneira rápida, simples, precisa e com baixo custo.

Malhotra e colaboradores⁵² demonstraram o uso das PMs em imunossensores para a detecção de 4 diferentes proteínas que são biomarcadores para o câncer bucal. Neste trabalho os autores modificaram PMs com marcadores eletroquímicos, no caso a enzima peroxidase de raiz forte (HRP), cuja proporção alcançada foi de 400.000 HRP por PM. Além disso a PM foi decorada com

120.000 anticorpos policlonais por PM, o que garantiu eficiência na captura do biomarcador, e proporcionou elevada sensibilidade, além de limites de detecção na faixa de fg mL⁻¹. A aplicação do método se deu em amostras reais de soro diluído de pacientes saudáveis e com câncer, e a validação do método foi feita através da comparação com o teste de ELISA, em que os resultados obtidos foram concordantes.

1.5 Eletrodos Impressos Descartáveis

Eletrodos impressos consistem em filmes condutores parcialmente cobertos com isolantes e depositados em uma superfície inerte. Este isolante recebe a função de limitar a área da superfície de trabalho, bem como os contatos elétricos. Para a fabricação de um sistema completo, contendo eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra-eletrodo faz-se uso de um mesmo suporte, o que leva a formação de uma célula eletroquímica descartável.

Há a possibilidade também da construção de biossensores com eletrodos impressos descartáveis, obtidos pela técnica de serigrafia. Estes são produzidos em larga escala, possuem baixo custo, garantem facilidade na modificação da superfície eletródica, além de possibilitar o desenvolvimento de sistemas miniaturizados, o que resultam na minimização das quantidades de amostra e reagentes utilizadas durante as análises.⁵³⁻⁵⁵ Para a fabricação do filme, em geral, utilizam-se tintas condutoras à base de compostos de carbono como grafite. A superfície deste filme, por sua vez, pode ser modificada com diferentes tipos de materiais como nanopartículas de metais, como Au, Ag ou Pt, a fim de aumentar a área eletroativa ou melhorar propriedades eletrocatalíticas.⁵³

Os eletrodos tradicionais apresentam certas desvantagens quando comparados aos eletrodos descartáveis, pois não necessitam de etapas de limpeza e polimento, e através de sua instrumentação simples, os últimos, permitem o desenvolvimento de sistemas portáteis, além de serem descartáveis.⁵⁶ Devido à alta sensibilidade e seletividade, sensores e biossensores construídos com os eletrodos impressos descartáveis estão sendo empregados para a detecção precoce e monitoramento de doenças, como câncer e DA, através da interação específica antígeno/anticorpo ocorrida na utilização de imunossensores.⁵⁷

Rama e colaboradores⁵⁸ caracterizam o acúmulo do peptídeo A β proveniente da progressão da DA no cérebro utilizando um imunossensor do tipo competitivo estruturado em eletrodos descartáveis impressos, nos qual os eletrodos foram construídos com tinta de carbono, e modificado com nanopartículas de ouro. Por meio de voltamogramas cíclicos, os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,1 e 0,4 ng mL⁻¹, respectivamente. Além disso, um intervalo linear de 0,5 e 500 ng mL⁻¹, sendo considerada como uma região bastante vasta e maior do que aquelas obtidas por métodos mais laboriosos e que exigem mais etapas de fabricação como é o caso da cromatografia líquida.

Além disso, pode-se fazer uso também de sistemas microfluídicos simples (Figura 1.4) que podem consistir em uma bomba de propulsão que pode ser uma bomba peristáltica ou de seringa, um injetor manual conectado à célula microfluídica, em que o arranjo de eletrodos de trabalho, acoplado a um contra-eletrodo e um eletrodo de referência, levam a formação dessa célula⁵⁹.

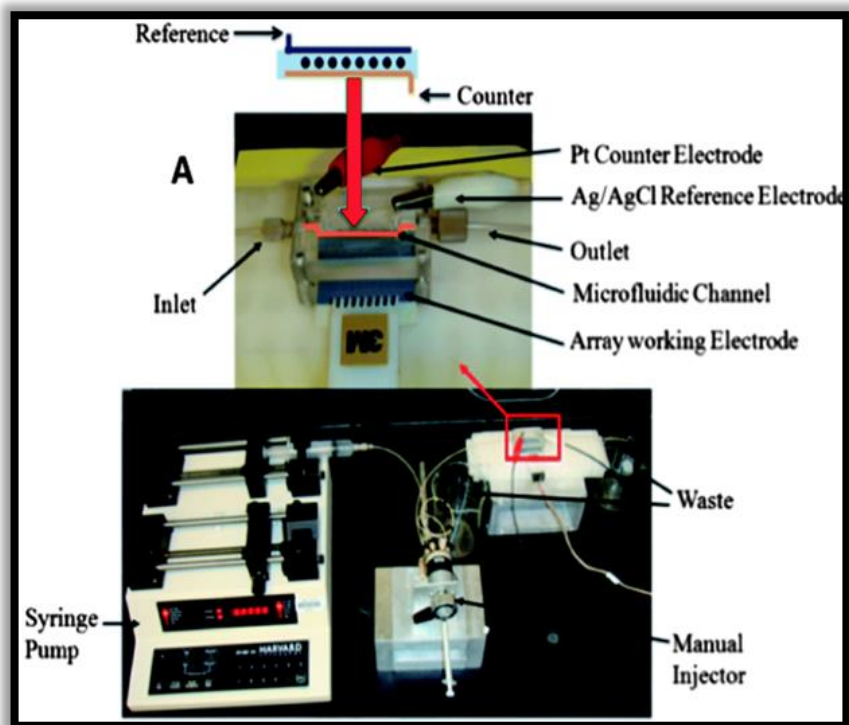


FIGURA 1. 4 - Sistema microfluídico composto pela bomba de seringa, injetor manual conectado à célula microfluídica.⁵⁹

O dispositivo microfluídico permite a redução do uso de amostra e reagentes, dispõe de tempos relativamente curtos de análise, oferece boa reprodutibilidade, além de ser um equipamento de fácil manuseio. Frente a estas vantagens, o uso deste dispositivo traz maior eficiência para um diagnóstico precoce de doenças já citadas, o que proporciona ao paciente um melhor acompanhamento da progressão da doença, além de um tempo prolongado de vida relativamente saudável,^{43,59-62} por meio do aumento da razão entre a área superficial do eletrodo e o volume de amostra, o que leva a um significativo aumento da velocidade da reação entre o anticorpo e o biomarcador, que por consequência facilitará a obtenção de maior sensibilidade, além de menores limites de detecção para os imunossensores.⁵⁹⁻⁶¹

Desta forma, uma vez que não há trabalhos referentes a utilização da proteína ADAM10 como biomarcador para DA e não há dispositivos sensores para a detecção da mesma, neste trabalho pretende-se realizar a determinação e quantificação do biomarcador ADAM10, por meio de imunossensores do tipo sanduíche acoplados a um sistema microfluídico utilizando um arranjo de eletrodos de trabalho descartáveis modificados com um poli(dimetil-dialilamônio), nanopartículas de ouro modificadas com glutathione, e anticorpos anti-ADAM10 monoclonais. PMs bioconjugadas com a HRP e o anticorpo anti-ADAM10 policlonal serão utilizadas a fim de garantir melhor eficiência, sensibilidade, seletividade, baixos limites de detecção e uma amplificação do sinal analítico para o diagnóstico precoce da DA.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é desenvolver um imunossensor descartável, mediante a construção de eletrodos descartáveis impressos, acoplado a um sistema microfluídico, a fim de obter um baixo limite de detecção, para o diagnóstico precoce da Doença de Alzheimer por meio da detecção do biomarcador ADAM10 em amostras de plasma sanguíneo.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), hidróxido de sódio (NaOH), partícula magnética (polyscience), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99,9 %, citrato trisódico, e NADH (número CAS 104809-32-7), Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), ácido nítrico (HNO_3 , 65%), e Tween 20 foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany), tampão ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES). Anticorpo monoclonal Anti-ADAM10 (Ab1) (Product no. ab59482), anticorpo policlonal Anti-ADAM10 (Ab2) (Product no. ab39180), ambos comprados da Abcam. Antígeno ADAM10 (PROSPEC, pro-476-b). Glicina, Albumina de soro bovino (BSA) (código A3059-10G) comprado da Sigma, hidroquinona (HQ), peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2), peroxidase de raiz forte (número CAS foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Esferas magnéticas funcionalizadas com grupo carboxílico foram obtidas da Polysciences, Inc. (Prod. no. 86011-10, Warrington, PA, USA). Tinta de carbono (C2030519P4, Gwent Electronic Materials Ltd, UK), tinta de Ag|AgCl (C2051014P10, Gwent Electronic Materials Ltd, UK).

Todos os reagentes químicos usados no preparo de soluções estoques e soluções padrão foram de grau analítico. Todas as soluções usadas nos procedimentos analíticos foram preparadas com água deionizada obtidas em um sistema de purificação Milli-Q da Millipore (Millipore, Bedford, USA).

3.2 Fabricação e construção da célula microfluídica

A célula microfluídica, que consiste no arranjo de oito eletrodos de trabalho, eletrodo de referência, eletrodo auxiliar foi construída utilizando materiais de baixo custo. Para isto, foi utilizado o software Silhouette Studio versão 3.0 para desenhar e configurar o molde da célula microfluídica. Por meio de uma impressora de corte eletrônica (Silhouette Cameo), conectada a um computador, e utilizando uma folha de adesivo de vinil, o desenho do layout foi recortado e as partes adesivas não desejadas foram retiradas por meio de uma pinça. Assim, o adesivo de vinil foi colado na folha de poliéster, e sobre eles foi aplicada a tinta de carbono, aplicando relativa pressão com auxílio de um rodo. Dessa maneira, a tinta de carbono pode se espalhar entre o molde do vinil e recobrir o substrato de poliéster. Em seguida o sistema foi submetido a um tratamento térmico por 30 minutos a 90°C. Após a secagem da tinta de carbono, a tinta de Ag|AgCl foi aplicada sobre o eletrodo de referência e tratado novamente por 30 minutos a 60°C sendo, em seguida, o adesivo removido, como ilustrado na Figura 3.1.

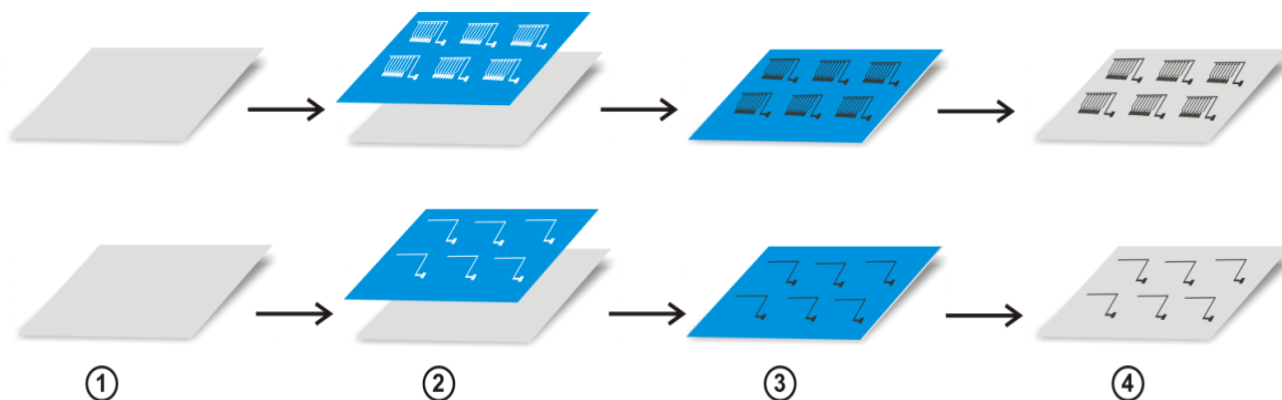


FIGURA 3. 1 - Representação esquemática da fabricação dos eletrodos: 1) Folha de transparência; 2) Transferência do adesivo de vinil recortado para folha de transparência; 3) Serigrafia da tinta de carbono e pintura da tinta de Ag/AgCl no eletrodo de referência e 4) Retirada do adesivo vinílico.

Por fim, a folha adesiva dupla face de poliestireno foi devidamente desenhada e cortada por uma impressora de recorte (F1 Suprimentos – Vinyl Cut), e utilizada como isolante na montagem da célula microfluídica, em que o canal da mesma foi devidamente recortado e construído a fim de permanecerem expostos somente a área eletroativa dos eletrodos de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo, bem como os contatos elétricos.

A partir do cartão recortado, em um de seus lados, foi colado o arranjo de oito eletrodos de trabalho (com 2,0 mm de diâmetro cada) e eletrodo auxiliar, enquanto do outro, a folha de transparência contendo o eletrodo de referência de Ag|AgCl. As dimensões do canal foram de 35,0 mm de comprimento por 4,0 mm de largura e 0,4 mm de espessura com volume interno de 56,0 μL , conforme ilustrado na Figura 3.2. Na folha de transparência contendo os eletrodos de trabalho, foram feitos dois orifícios nas extremidades do canal microfluídico com a função de entrada e saída de soluções. Ao orifício de entrada foram fixados dois conectores de poliéter-éter-cetona (Peek) de 0,2 mm, presos com o auxílio de uma fita Command 3M adquirida no comércio local.

Finalmente, para o transporte de soluções no sistema microfluídico foi utilizado uma bomba de seringa (New Era Pumping System NE-1000), ligada ao conector Peek, já mencionado acima, por meio de uma válvula injetora manual (Rheodyne, 9725i).

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um multipotenciostato DropSens modelo μ stat 8000 (Espanha) ligado ao sistema microfluídico e controlado pelo software Dropview 8400 instalado em um computador pessoal.

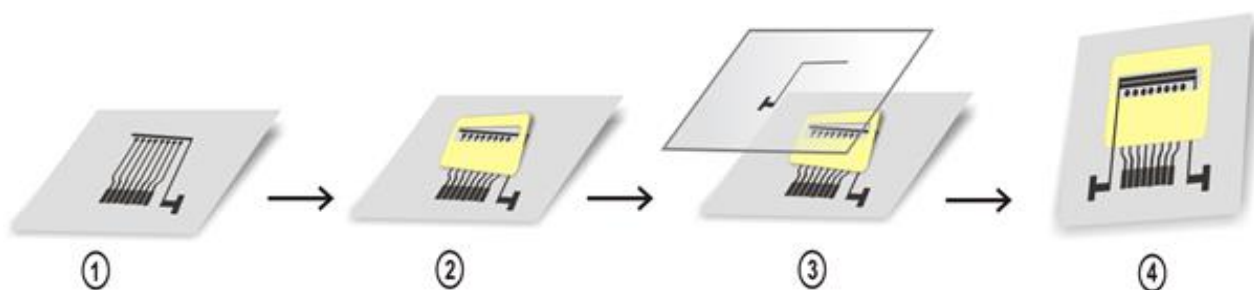


FIGURA 3. 2 - Montagem da célula microfluídica: 1) Arranjo de eletrodos de trabalho e auxiliar na folha de transparência, 2) colagem do adesivo dupla face; 3) inserção do eletrodo de referência e 4) célula microfluídica montada.

3.3 Síntese de nanopartículas de Ouro (AuNPs) modificadas com Glutathiona (GHS)

Para a síntese das AuNPs pesou-se 0,079 g de HAuCl_4 (ácido cloroáurico) e 0,0308 g de glutathiona que foram misturados com 2,0 mL de ácido acético e 12,0 mL de metanol, resultando em uma solução de cor amarelo claro. Em seguida, foi preparada uma solução de NaBH_4 (borohidreto de sódio) por diluição

de 0,12 g de NaBH_4 em 6,0 mL de água milli-Q. Então, adicionou-se essa solução a anterior sob rápida agitação, deixando-a agitando por 2h. Esta solução foi filtrada em uma membrana de filtração molecular de 50 kDa (previamente lavada com uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) durante a centrifugação a 3500 rpm. O sobrenadante foi lavado quatro vezes com água milli-Q e as partículas dispersas em tampão Hepes 20 mmol L^{-1} (pH=8,0).

3.4 Construção de filmes *Layer by Layer* (LbL) de AuNPs e cloreto de poli(dialildimetil-amônio) (PDDA) e imobilização do Ab1 sobre o eletrodo de carbono

Inicialmente o eletrodo de carbono foi lavado com água deionizada e colocado em uma placa de Petri umedecida para que o processo fosse mantido sempre em câmara úmida. Sobre o eletrodo de trabalho (área de $3,14 \text{ mm}^2$ cada um) foi adicionado $20 \mu\text{L}$ de uma solução contendo PDDA 2 mg mL^{-1} e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e deixados por 20 minutos. Após esse tempo, o eletrodo modificado foi lavado cuidadosamente com água deionizada e o excesso seco com papel absorvente. Em seguida, secou-se o eletrodo sob fluxo de nitrogênio gasoso. Então, $20 \mu\text{L}$ da dispersão de nanopartícula de ouro modificada glutaciona sintetizadas (AuNPs-GHS) 2 mg mL^{-1} foram adicionadas sobre os eletrodos de trabalho ($5 \mu\text{L}$ em cada um) e deixadas por mais 20 minutos. Em seguida, o excesso AuNPs-GHS foi retirado da superfície do eletrodo e seco com fluxo de nitrogênio gasoso.

Uma vez modificada superfície dos eletrodos com o filme LbL, para a imobilização de Ab1, foi adicionado $20 \mu\text{L}$ de uma solução recém-preparada de EDC $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ em solução aquosa de NHS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, que foi deixada por 10

minutos, para a ativação dos grupos carboxílicos. Ao término do tempo, o eletrodo foi mergulhado três vezes em um béquer contendo água deionizada, para a lavagem, e seco cuidadosamente com papel higiênico. Em seguida, 20 μL da solução de Ab1 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparada em solução tampão fosfato salina (PBS) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, foi adicionada e deixada por 18 horas à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ para a completa imobilização do anticorpo sobre o eletrodo.

Por fim, os eletrodos foram lavados com aproximadamente 1,0 mL de solução de PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 e Tween-20 0,05% (PBS-T), e logo após, bloqueado por 1 hora com solução de BSA (2%), a fim de evitar reações não específicas, e assim lavado com solução de PBS-T pH 7,4, e armazenado sob refrigeração.

3.5 Preparo do bioconjugado composto por Ab2, PMs e enzimas HRP (Ab2-PM-HRP)

Primeiramente, 98 μL de PMs foram lavadas três vezes com 1,0 mL do tampão MES $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2. Essa lavagem consistiu em agitar a suspensão em vórtex por 5 minutos à temperatura ambiente, e separá-la magneticamente através de um suporte com imã que atua na lateral dos Eppendorfs® como pode ser visto na Figura 3.3.



FIGURA 3. 3 - Procedimentos para a lavagem das PMs (A) PMs diluídas em tampão MES $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,2 (B) Separação magnética por meio de um suporte com imã (C) Retirada do sobrenadante.

À PM lavada, adicionou-se $1,0 \text{ mL}$ de solução EDC ($3,2 \text{ mg}$ de EDC em $1,0 \text{ mL}$ de MES). A dispersão resultante foi lavada duas vezes com tampão MES $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, agitada em vórtex por 5 minutos, e, em seguida, deixada por 30 minutos no agitador rotatório. Após esse tempo, foi separada magneticamente e o sobrenadante foi descartado. A essa mistura foi adicionado $10,0 \mu\text{L}$ de Ab2, $990 \mu\text{L}$ de PBS $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0, obtendo uma concentração final de Ab2 equivalente a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, que foi agitada em vórtex e posteriormente deixada por 24 horas sob agitação em agitador rotatório à temperatura ambiente. A solução então foi separada magneticamente e lavada com $600 \mu\text{L}$ de PBS-T. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se HRP $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$ preparada antecipadamente em PBS pH 7,0 contendo 0,5% de BSA ($750 \mu\text{L}$ PBS + $240 \mu\text{L}$ HRP a partir da solução estoque de HRP $5,0 \text{ m.mL}^{-1}$). A mistura resultante foi separada magneticamente e lavada quatro vezes com solução de PBS-T e 0,1% BSA, descartando o sobrenadante.

Às partículas modificadas adicionou-se $1,0 \text{ mL}$ de glicina $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0 sendo a dispersão agitada em vórtex, e em seguida colocadas no agitador

rotatório por 30 minutos à temperatura ambiente. Ao final, a mistura, que chamamos de complexo, foi separada magneticamente, e lavada três vezes com solução de PBS-T e 0,1% BSA, e ressuspensas em 400 μL da mesma.

3.6 Captura do biomarcador ADAM10 com Ab2-PM-HRP

Inicialmente 20 μL do complexo Ab2-PM-HRP, 320 μL de PBS pH 7,4 e 20 μL do biomarcador na concentração desejada diluído em soro de bezerro foram misturados e incubados, sob agitação constante e lenta, por 30 minutos à 37°C. Em seguida, foram separados magneticamente, lavados três vezes com 400 μL de uma solução de PBS-T pH 7,4 + BSA (2%), descartando o sobrenadante, e ao fim dispersos em 125 μL da mesma solução, que foram injetados no sistema microfluídico.

3.7 Etapas envolvidas no Sistema Microfluídico desenvolvido

O sistema microfluídico foi constituído de uma bomba de seringa (New Era Pumping System NE-1000) responsável pela propulsão das soluções, uma válvula manual de injeção (Rheodyne, 9725i) e o dispositivo microfluídico construído, conforme Figura 3.4.

A bomba de seringa foi ligada ao conector de entrada do dispositivo microfluídico por meio da válvula de injeção, que está diretamente conectada a alça de amostragem. Para isso dispôs-se de um conector poliéter-éter-cetona (Peek) de

0,2 mm, que foi fixado no dispositivo com o auxílio de uma fita adesiva Command 3M adquirida no mercado local.

Uma solução carreadora de PBS-T + BSA 0,1% preencheu a seringa da bomba de seringa, e esta foi condicionada a uma vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ e uma alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$ foi utilizada. Por meio da válvula injetora manual, a dispersão das PMs com o analito já capturado foi injetada. Então, com o fluxo ativado, através da válvula manual, a dispersão alcançou o dispositivo. Após o preenchimento de todo canal microfluídico, o fluxo foi interrompido, para que houvesse a captura do analito pelo Ab1 imobilizado na superfície dos eletrodos de trabalho. Após esse tempo de captura, que chamamos de tempo de incubação, o fluxo foi religado e para que por meio da passagem da solução carreadora, as PMs não conjugadas fossem removidas por lavagem.

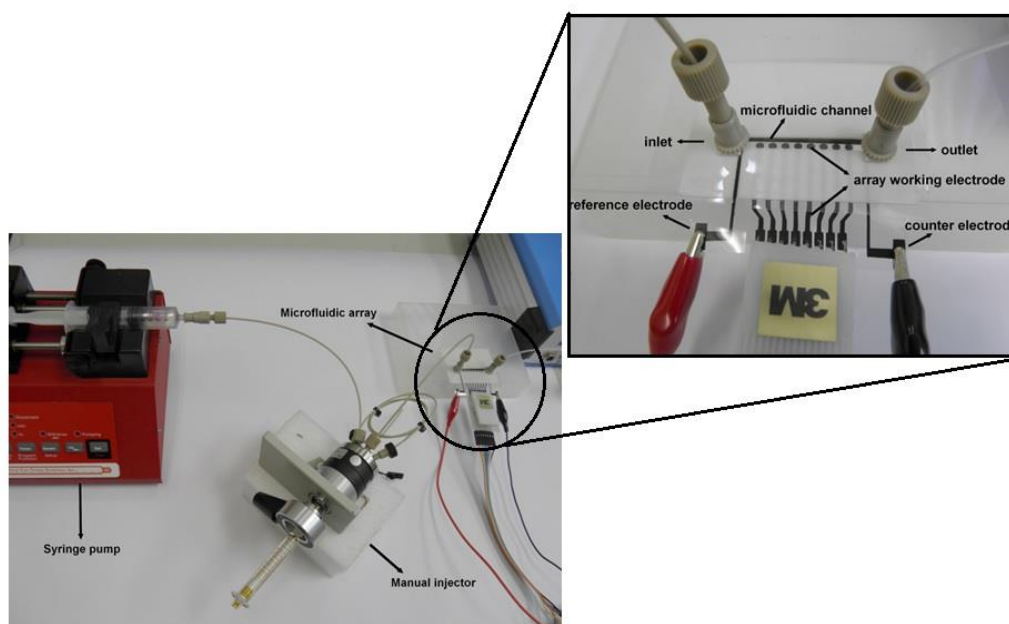


FIGURA 3. 4 - Sistema microfluídico, consistindo da bomba de seringa, injetor manual e célula microfluídica.

3.8 Medidas Eletroquímicas

Durante as medidas eletroquímicas um potencial fixo de -0,2 V foi aplicado, para que houvesse a redução da HQ,⁴³ em uma solução carreadora contendo PBS-T e BSA pH 6,5. As soluções de H₂O₂ 0,1 mmolL⁻¹ e HQ 1,0 mmolL⁻¹ foram injetadas no momento das medidas e foram preparadas imediatamente antes do uso em tampão PBS pH 6,5, e borbulhadas com gás nitrogênio à temperatura ambiente.

3.9 Amostras reais de plasma de idosos controle e idosos com diagnóstico de Alzheimer

As amostras de plasma sanguíneo dos idosos foram obtidas no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) do Departamento de Gerontologia da UFSCar, coordenado pela Professora Dra. Márcia Regina Cominetti e seguiu todos os procedimentos éticos, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSCar, nº 427/2009. O estudo conta com as instituições de saúde colaborativas: Centro Municipal de Especialidades (CEME) e Unidades de Saúde da Família (USFs) de São Carlos, Unidade Saúde Escola (USE) da UFSCar e Instituto de Biociências - UNESP/Campus Rio Claro. Foi criado um biorrepositório para depósito das amostras biológicas dos sujeitos da pesquisa, segundo a resolução 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde. Todas as amostras foram estocadas a -20 °C antes dos ensaios.

Os participantes foram idosos com idade de 60 ou mais, usuários de três serviços de saúde do município de São Carlos, serviços de referência e

contra referência em demência: Unidade Saúde Escola (USE), Centro Municipal de Especialidade em Saúde (CEME) e Unidades de Saúde da Família (USFs) e idosos usuários do Instituto de Biociências da UNESP - Campus de Rio Claro. Os participantes foram divididos em três grupos: idosos com doença de Alzheimer, idosos com comprometimento cognitivo leve e idosos controles (sujeitos saudáveis). Para preservar o anonimato, as siglas DA (sujeito com doença de Alzheimer), TNCL (transtorno neurocognitivo leve) e CT (sujeito controle) foram utilizadas para identificar cada um dos sujeitos da pesquisa.

A avaliação dos pacientes com diagnóstico de DA e TNCL foi realizada por meio do Clinical Dementia Rating (CDR), que é uma escala validada para o português do Brasil de avaliação clínica da demência e seu objetivo é graduar a demência, em especial na DA, além de identificar casos de TNCL.

As amostras foram separadas nos seguintes grupos:

- Grupo DA, classificado em três níveis: leve (CDR1), moderado (CDR2) ou avançada (CDR3) de acordo com os critérios do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINCDS) e o *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA) (MCKHANN et al., 2011);
- Grupo Controle (CT) são idosos sem presença de sinais ou sintomas de declínio cognitivo ou doença neurológica (identificados através do CDR0).

As Amostras de plasma sanguíneo de idosos com DA, TNCL e CT foram analisadas e o teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi realizado com as mesmas amostras como método comparativo, afim de avaliar a precisão do imunossensor.

As amostras foram analisadas utilizando o método proposto (imunossensor) e por um segundo método comparativo, utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA.

Um kit ELISA comercial da Cloud-Clone Corp (Produto nº SEA766Hu, Houston, USA) foi utilizado. As amostras não necessitaram de uma diluição prévia

e a leitura foi feita em leitora de ELISA Labtech LT-4000 (Labtech International Ltd, Uckfield, UK) em 450 nm.

Para os ensaios utilizando os imunossensores descartáveis, o plasma foi previamente descongelado e diluído 40.000 vezes em tampão PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 7,0 para detecção da proteína ADAM10 utilizando o imunossensor descartável proposto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da repetitividade e reprodutibilidade do arranjo de eletrodos

Inicialmente, para a caracterização dos eletrodos de trabalho foram feitos estudos a fim de averiguar a repetitividade e a reprodutibilidade dos mesmos. A área dos mesmos era $3,14 \text{ mm}^2$, e o procedimento foi feito ao utilizar uma célula eletroquímica convencional, contendo um contra-eletrodo de platina, eletrodo de referência Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$, e o arranjo descartável contendo os oito eletrodos de trabalho. Uma sonda eletroquímica de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada sendo variado o potencial de 0 a $0,5 \text{ V}$ e as respostas eletroquímicas foram caracterizadas por voltametria cíclica com de um multipotenciostato, e podem ser conferidas na Figura 4.1.

A respeito do estudo de repetitividade (Figura 4.1 A), observou-se que os oito eletrodos de trabalho contidos no arranjo geraram picos anódicos bastante similares com média de $2,90 \pm 0,13 \mu\text{A}$ e coeficiente de variação entre os mesmos igual a $4,34\%$, indicando que não há interferência cruzada entre eles, além de apresentarem boa precisão. Quanto ao estudo de reprodutibilidade (Figura 4.1 B), quatro arranjos, cada um composto por oito eletrodos foram comparados, sendo que todos eles apresentaram picos anódicos na média de $2,92 \pm 0,14 \mu\text{A}$ e coeficiente de variação também inferior a $5,0\%$, para $n=32$, apontando que os diferentes arranjos de eletrodos apresentaram resposta similar com boa precisão.

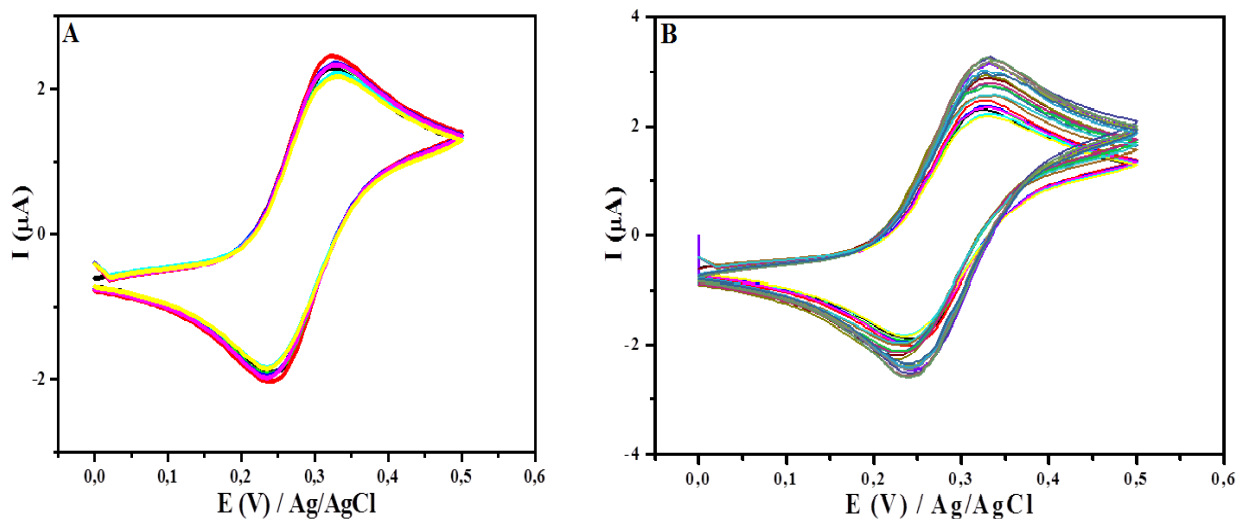


FIGURA 4. 1 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ao variar o potencial de 0 a 0,5 V. (A) Repetitividade do arranjo com 8 eletrodos; (B) Reprodutibilidade entre quatro diferentes arranjos.

4.2 Estudo da influência da velocidade de varredura na resposta eletroquímica em meio de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$

O estudo da influência de diferentes velocidades de varredura foi realizado utilizando os mesmos procedimentos do Item 4.1. As medidas foram realizadas antes e após a modificação dos eletrodos de carbono com um filme de PDDA e AuNPs-GHS em diferentes velocidades de varredura, sendo elas 10, 25, 50, 75, 100, 125 mVs^{-1} . Por meio do conjunto de voltamogramas cíclicos (Figura 4.2 A) foi possível notar uma boa reversibilidade do par redox, com diferença dos potenciais de pico igual a $68,8 \text{ mV}$, resultando de uma cinética rápida.⁶³ Além

disso, é possível observar que os potenciais de pico anódico e catódico independem da velocidade de varredura.

A partir dos voltamogramas da Figura 4.2 A foi construído o gráfico da relação logarítmica entre corrente de pico anódica em função da velocidade de varredura (Figura 4.2 B), obtendo um coeficiente angular igual a 0,45, sendo este valor próximo ao encontrado na literatura ($\sim 0,50$)⁶⁴ o que indica que o processo de oxidação do ácido ferroceno monocarboxílico é controlado por difusão.

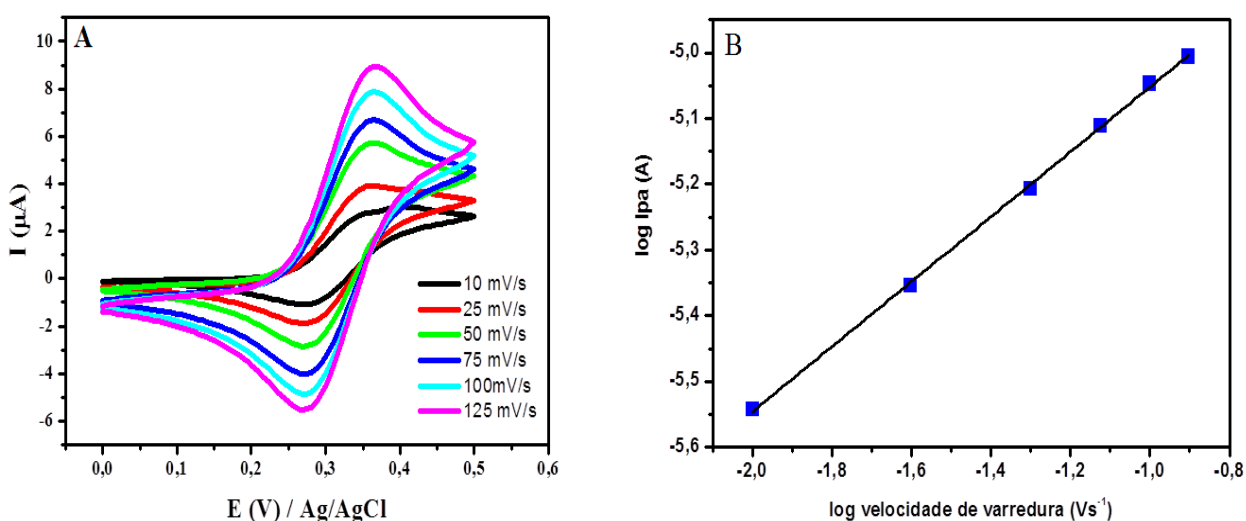


FIGURA 4. 2 - (A) Voltamogramas cíclicos obtido em solução de ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ dos eletrodos de trabalho sem modificação em diferentes velocidades de varredura; (B) Relação logarítmica entre a corrente de pico anódico e a velocidade de varredura de potenciais em solução ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Em seguida, a partir dos voltamogramas da Figura 4.2 A, foi obtida a relação da corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Por intermédio da Figura 4.3, observa-se uma boa linearidade, com coeficiente de correlação linear igual a 0,998. O valor da área eletroativa foi obtida

levando-se em conta a equação de Randles-Sevcik⁶⁵ (Equação 3), em que I_p é a corrente de pico, n é o número de elétrons, A é a área do eletrodo (cm^2), C é a concentração do ácido ferroceno monocarboxílico (mol cm^{-3}) e D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$).

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Equação 3}$$

$I_p = K v^{1/2}$; onde K é o coeficiente angular da reta.

Sendo a área geométrica do eletrodo igual a $3,14 \text{ mm}^2$, para o eletrodo sem modificação a área eletroativa encontrada foi de $3,68 \text{ mm}^2$, apesar da elevada rugosidade o maior valor da área eletroativa não é significativo, pois a tinta de carbono possui polímeros que são maus condutores elétricos.

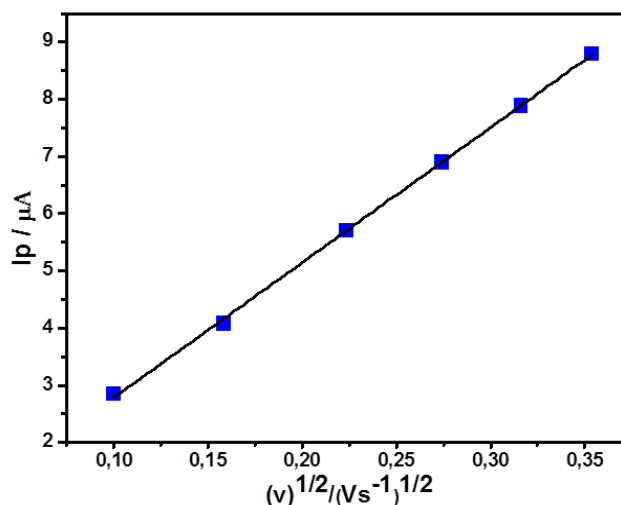


FIGURA 4. 3 – Variação da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura do mesmo eletrodo sem modificação.

O estudo da influência da velocidade de varredura se deu também após a modificação dos eletrodos de carbono com um filme de PDDA e AuNPs-GHS ao variar da mesma maneira as velocidades de varredura. Por meio do conjunto de voltamogramas cíclicos (Figura 4.4 A) é possível notar que não há reações

paralelas, sendo a diferença de potenciais de pico encontrada inferior a 90 mV. Esta configuração indica que a cinética que comporta a transferência de elétrons é rápida o suficiente para manter as concentrações das espécies redox na interface dos eletrodos, comportando-se, novamente, como um processo reversível. Além disso, é possível afirmar que os potenciais de pico anódico e catódico independem da velocidade de varredura.

A partir dos voltamogramas da Figura 10 foi feita a relação logarítmica da corrente de pico anódica em função do logaritmo da velocidade de varredura (Figura 4.4 B), obtendo um coeficiente angular próximo a 0,5, o que indica que após a modificação dos eletrodos a reação de oxidação também é controlada por difusão.

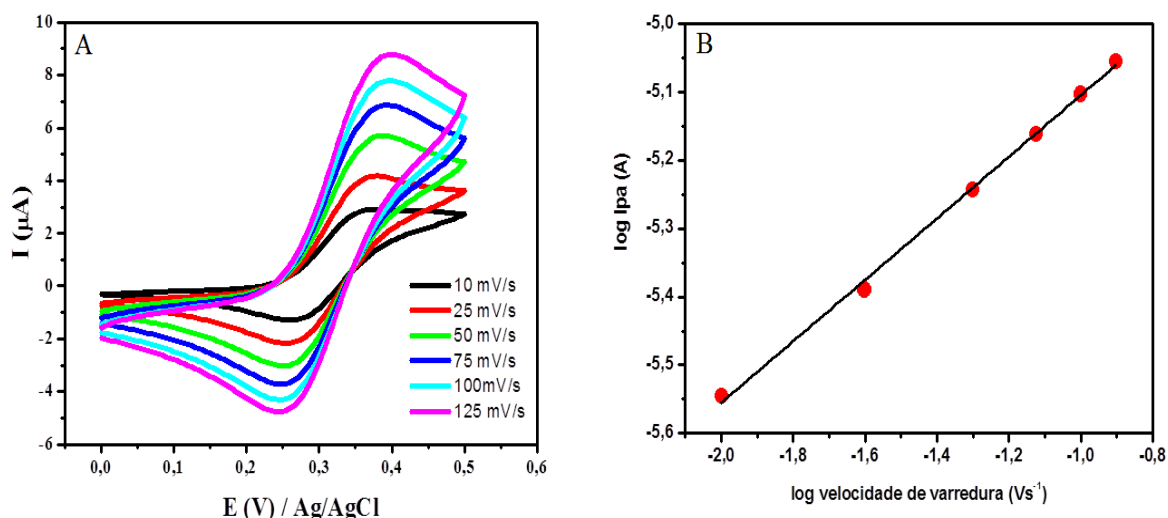


FIGURA 4. 4 - (A) Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de trabalho modificado com PDDA e AuNPs-GSH em diferentes velocidades de varredura, (B) Relação logarítmica entre a corrente de pico anódica e a velocidade de varredura de potenciais para os mesmos eletrodos de trabalho modificados com PDDA e AuNPs-GSH em solução ferroceno monocarboxílico 1 mmol L^{-1} e KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Em seguida, foi feita a relação entre a corrente de pico anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura, a fim de averiguar o valor da área eletroativa

para os eletrodos após a modificação. Por meio da Figura 4.5, observou-se boa linearidade, com coeficiente de correlação linear igual a 0,999. O valor da área eletroativa foi calculado utilizando a equação de Randles-Sevcik (Equação 3), e obtendo como resultado o aumento dessa área. Para o eletrodo modificado com PDDA e AuNPs-GSH, a área foi de $4,37 \text{ mm}^2$, o que indica um aumento de aproximadamente 20% comparado com a área obtida a partir do arranjo de eletrodos sem modificação. A presença do polícatión PDDA pode ser responsável por um aumento ainda maior devido a sua baixa condutividade.

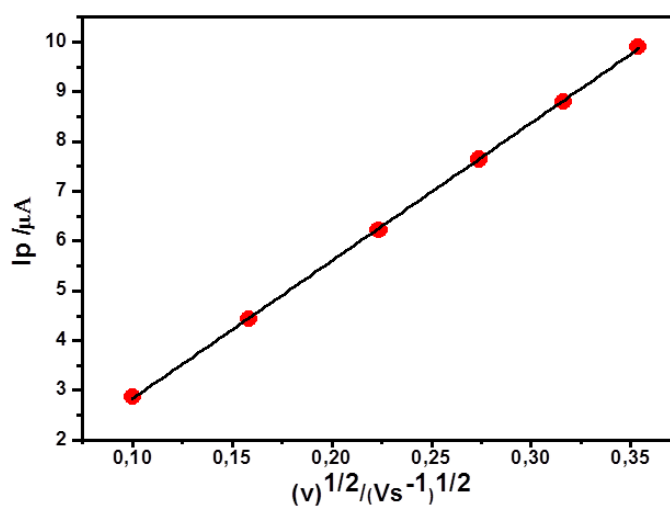


FIGURA 4. 5 - Variação da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais dos mesmos eletrodos de trabalho modificados com PDDA e AuNPs-GSH.

4.3 Imobilização covalente do anticorpo anti-ADAM10 sobre os eletrodos modificados e caracterização do sistema microfluídico.

Após a caracterização dos eletrodos de trabalho, partiu-se então para a caracterização do imunossensor acoplado ao sistema microfluídico, em que os sinais foram obtidos por meio de uma detecção amperométrica. Uma vez imobilizado os anticorpos Ab1 na superfície dos eletrodos de trabalho, foi realizado a captura dos biomarcadores utilizando o bioconjugado injetado através da válvula manual. A dispersão alcançou o dispositivo com o auxílio da solução carreadora PBS-T + BSA 0,1% contida na bomba de seringa do nosso sistema microfluídico. Após o preenchimento de todo o canal microfluídico do dispositivo eletroquímico o fluxo foi interrompido para que houvesse a captura do analito pelo Ab1. Esse tempo de captura (tempo de incubação) foi estudado, variando o tempo em 10, 20 e 30 minutos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.6.

Após esse tempo o fluxo foi religado e por meio da passagem da solução carreadora, as PMs não conjugadas foram removidas por lavagem. Para a realização das medidas eletroquímicas foi aplicado um potencial fixo de -0,2 V em uma solução de H_2O_2 0,1 mmol L^{-1} e HQ 1,0 mmol L^{-1} preparadas em tampão PBS pH 6,5, e borbulhadas com gás nitrogênio à temperatura ambiente.

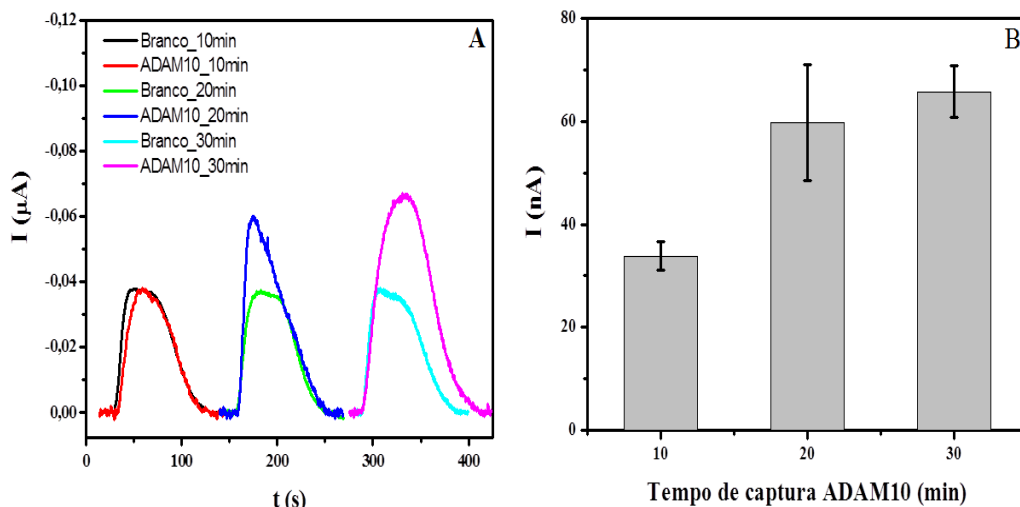


FIGURA 4. 6 - (A) Sinais transientes de corrente obtidos para o biomarcador ADAM10 $0,555 \text{ pg mL}^{-1}$ em diferentes tempos de incubação com injeção de uma solução de H_2O_2 e HQ, e uma solução carreadora de PBS-T + BSA 0,1% com vazão de $100 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. Potencial aplicado: $-0,2 \text{ V}$. (B) Média das correntes de pico provenientes da ADAM10 variando o tempo de incubação em 10, 20 e 30 minutos do complexo no eletrodo.

Como visto, na Figura 4.6, tem-se a comparação entre cada tempo de incubação e o branco, e nota-se que o melhor tempo de incubação foi de 30 minutos, pela maior corrente de pico obtida nesse tempo, enquanto que para o tempo de 10 minutos, a corrente foi equivalente àquela obtida durante a medida do branco. Essas informações conferem com resultados obtidos na literatura.⁶⁶ Tempos maiores que 30 minutos não foram estudados, uma vez que as análises tornar-se-iam relativamente longas.

A respeito da detecção amperométrica, o ciclo catalítico ocorrido após a injeção da solução de medida está ilustrado na Figura 4.7. Na superfície dos eletrodos de trabalho ocorre a redução da hidroquinona que foi catalisada pela enzima HRP usada para a modificação da partícula magnética. A HRP é

comumente utilizada como marcador de reações de afinidade devido ao fato de manter uma resposta estável por longos períodos de tempo à temperatura ambiente, abranger um amplo intervalo de pH, possuir baixo custo e ser facilmente encontrada comercialmente em diversos graus de pureza.

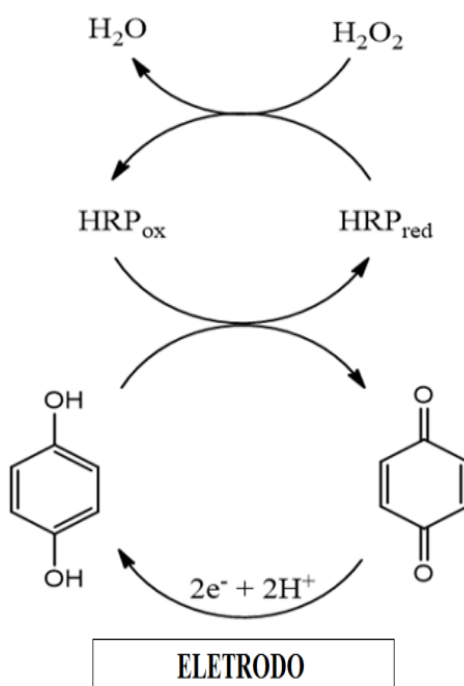


FIGURA 4. 7 - Diagrama das reações envolvidas no mecanismo de resposta do imunossensor proposto, sendo HRP_{ox} a peroxidase oxidada e HRP_{red} a peroxidase reduzida.

Quando há a presença de um mediador de elétrons, este permite a transferência de elétrons do sítio ativo da enzima oxirredutase para a superfície do eletrodo de trabalho. Assim, a enzima HRP sofre oxidação pelo peróxido de hidrogênio e, para retornar à sua forma nativa, oxida uma molécula doadora de elétrons, no caso a hidroquinona, que é reduzida na superfície do eletrodo gerando uma variação de corrente que é proporcional à concentração do analito.

Outro parâmetro avaliado na etapa de imobilização das biomoléculas sobre os eletrodos foi a vazão, variando-a em 50, 100, 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. O tempo de incubação utilizado foi de 30 minutos, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.8.

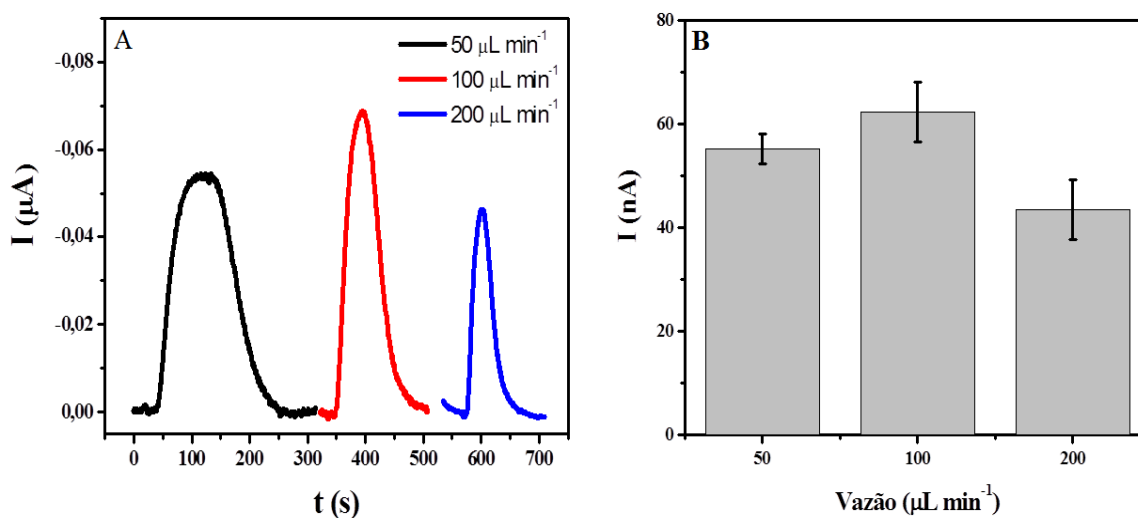


FIGURA 4. 8 - (A) Sinais transientes de corrente obtidos para o biomarcador ADAM10 $0,555 \text{ pg mL}^{-1}$ em diferentes vazões da solução carreadora com injeção de uma mistura de H_2O_2 e HQ. Tempo de incubação de 30 min e potencial aplicado: $-0,2 \text{ V}$. (B) Média das correntes de pico provenientes da ADAM10 ao variar a vazão da solução carreadora em 50, 100 e 200 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Como pode ser observado na Figura 4.8, com o fluxo de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ obteve-se um pico relativamente alargado, com uma corrente de pico não tão acentuada. Com o fluxo de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$, a corrente de pico diminuiu consideravelmente. Enquanto que na vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ ocorreu uma maior corrente de pico, sem acontecer o alargamento do mesmo, sendo este fluxo o que apresentou melhor resposta para a melhor captura do biomarcador no sistema proposto.

4.4 Curva analítica

Por meio dos parâmetros já otimizados, a curva analítica para o imunossensor descartável proposto para a DA foi, então, obtida, utilizando soro de bezerro, que consiste em uma matriz complexa que apresenta composição similar ao do soro humano. A curva analítica obtida está representada na Figura 4.9 A, em que o valor do branco já está devidamente descontado. A partir da curva analítica obtendo-se um excelente limite de detecção (LOD) de $5,56 \text{ fg mL}^{-1}$, sensibilidade de $1,47 \text{ nA mL fg [ADAM10]}^{-1}$ e intervalo linear de $5,56 \text{ fg mL}^{-1}$ a $1,389 \text{ pg mL}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear igual a 0,993. Os sinais transientes de corrente utilizados para a construção da curva analítica estão apresentados na Figura 4.9 B.

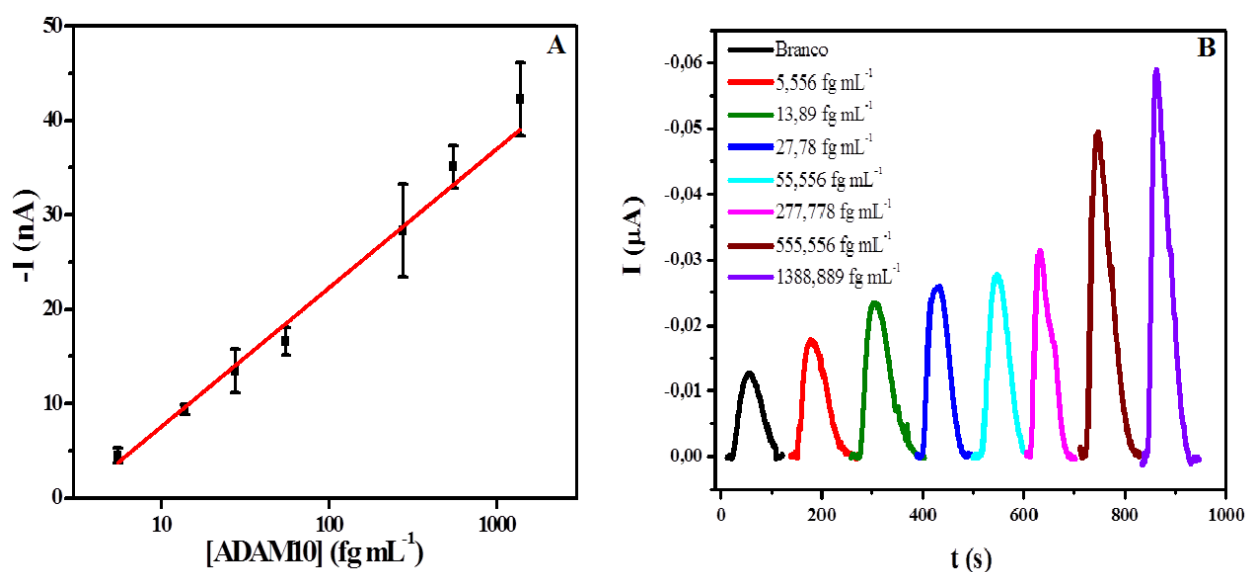


FIGURA 4. 9 - Curva analítica obtida em soro de bezerro. (A) Variação da corrente em função concentração do biomarcador ADAM10 e (B) Sinais transientes de corrente.

4.5 Determinação de ADAM10 em Amostras Reais de Plasma de Pacientes

O imunossensor proposto foi utilizado para a determinação de ADAM10 em amostras reais de plasmas de pacientes idosos com Alzheimer e de idosos saudáveis.

As amostras foram previamente analisadas pela doutoranda Patricia do Departamento de Gerontologia por meio do método de ELISA. Ao compararmos esses resultados com os obtidos por meio do imunossensor descartável, obtivemos as barras ilustradas na Figura 4.10, equivalentes às concentrações da proteína ADAM10 no plasma dos pacientes, sendo em (A) as amostras de pacientes controle e (B) as amostras de pacientes portadores da DA. Na figura, observa-se que os resultados obtidos foram compatíveis, sendo que para o método de ELISA foi feito em duplicata, enquanto com o imunossensor descartável foram utilizados n=8, bem como a diluição das amostras realizada no método proposto foi de 40000 vezes, enquanto no ELISA não houve diluição das mesmas.

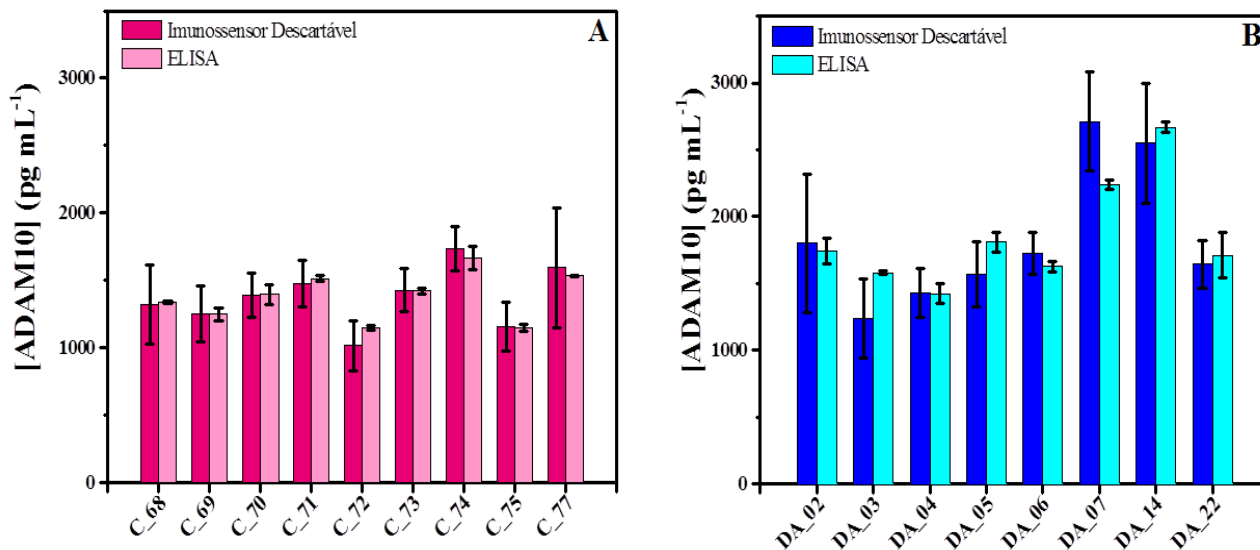


FIGURA 4. 10 - Comparação entre os resultados obtidos pelo método de ELISA e o imunossensor descartável, provenientes das concentrações da proteína ADAM10 em amostras de plasma de idosos. Idosos (A) sadios e (B) portadores da DA.

Com os resultados obtidos foi possível observar a expressão da doença no cérebro, de acordo com a progressão da mesma, em que para pacientes controle foi obtido uma menor concentração de ADAM10 quando comparada as concentrações encontradas em estágios mais avançados da DA (Figura 4.11).

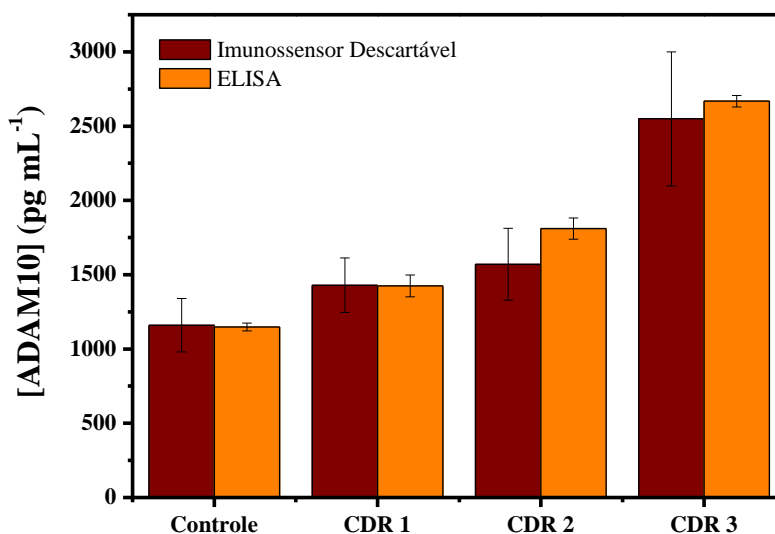


FIGURA 4. 11 – Comparação dos resultados obtidos com ELISA e com o imunossensor descartável em amostras de plasma de idosos cognitivamente saudáveis (controle) e idosos com doença de Alzheimer (DA), em diferentes estágios da doença, identificados como CDR 1 (DA leve), CDR 2 (DA moderada) e CDR 3 (DA grave).

Desta forma, o método desenvolvido apresentou como vantagens, o baixo custo além de tempo curto de análise quando comparado ao método de ELISA. O método permite uma grande diluição da amostra (40.000 vezes), o que reduz o consumo e minimiza a ação de possíveis interferentes, além da capacidade de detecção de concentrações muito baixas do biomarcador, o que pode oferecer ao paciente um recurso menos invasivo devido ao baixo volume de amostra necessário, quando comparado ao diagnóstico realizado em líquido cefalorraquidiano.

5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento da célula eletroquímica totalmente descartável com um arranjo de oito eletrodos de trabalho para a detecção da proteína ADAM10 foi eficaz, e possibilitou uma maior rapidez nas análises, uma vez que obteve-se oito respostas simultâneas para uma única amostra, o que garante maior segurança no diagnóstico.

Além disso, o uso das PMs para captura, separação e pré-concentração do biomarcador contribuiu para o bom desempenho do dispositivo. A proteína ADAM10 revelou ser um biomarcador viável para o diagnóstico precoce da DA, bem como para o monitoramento da mesma, uma vez que foi possível verificar um aumento da sua concentração conforme a progressão da doença. O biomarcador, além disso, pôde ser detectado no plasma sanguíneo, o que proporciona ao paciente maior segurança, uma vez que a coleta é feita de forma simples e menos invasiva, quando comparada a coleta do líquido cefalorraquidiano.

O imunossensor descartável acoplado ao sistema microfluídico para a detecção e quantificação do biomarcador ADAM10 mostrou-se uma excelente alternativa para a detecção precoce da DA quando aplicado em amostras reais de idosos saudáveis e portadores da DA em diferentes estágios, o que pode vir a proporcionar ao paciente uma melhor qualidade de vida. O dispositivo desenvolvido demonstrou ser um método simples, rápido e de baixo custo para detecção do biomarcador ADAM10 apresentando um baixo limite de detecção e excelente correlação com o método ELISA, o que confirma sua precisão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organização Mundial de Saúde. The uses of epidemiology in the study of the elderly. Geneva: WHO; 1984.
2. BRASIL "Lei nº 8.842, de janeiro de 1994". Dispõe sobre a política nacional do idoso; cria o conselho nacional do idoso e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 4 jan. 1994. Seção 1, p. 1-5.
3. BRASIL "Lei nº 10.741, de 1º de outubro de 2003.". Dispõe sobre o Estatuto do Idoso e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, ano 140, n. 192, 3 out. 2003. Seção 1, p. 1-6.
4. NATIONS, U. "World Population Prospects: The 2012 Revision. Highlights and Advance Tables". *Population and development review*, **36**: 775, 2013.
5. VERAS, R. "Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações". *Rev Saúde Pública*, **43** (3): 548, 2009.
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese de Indicadores Sociais - 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicsois2009/>>. Acesso em dez. 2015.
7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas: 2013. v. 39, p. 1 – 63, 2014.
8. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese de Indicadores Sociais - 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicsois2013/>>. Acesso em dez. 2015.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese de Indicadores Sociais - 2014. Disponível em: <http://www.proplan.ufam.edu.br/SIS_2014.pdf>. Acesso em dez. 2015.
10. SCHIMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B.; E SILVA, G.A.; MENEZES, A.M.; MONTEIRO, C.A.; BARRETO, S.M.; CHOR, D. & MENEZES, P.R. "Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges". *The Lancet*, **377**: 1949, 2011.
11. MACHADO, L.Q., Z. P. V., Negligência e maus-tratos em idosos. In: FREITAS, E. V. (Org.). Tratado de Geriatria e Gerontologia. 2. Ed. 2006, Rio de Janeiro, p. 1152-1159. p.
12. SANTOS, S.M.A. & RIFIOTIS, T., Cuidadores familiares de idosos dementados: Uma reflexão sobre o cuidado e o papel dos conflitos na dinâmica da família cuidadora. In: SIMSON, O.R.M.V.; NERI, A.L.; CACHIONI, M. (Org.) As múltiplas faces da velhice no Brasil. Editora Alínea. 2003. p. 141-164. p.
13. ADI "Alzheimer's Disease International. Dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors". *Alzheimer's Disease International*: 1, 2014.
14. SIMSON, O.R.M.V.; NERI, A.L. & CACHIONI, M., As Múltiplas Faces da Velhice no Brasil. Editora Alínea. Campinas - SP, 2003, p. 141-164. p.
15. SMITH, M.A.C. "Doença de Alzheimer". *Rev. Bras. Psiquiatr.*, **21**: SII 3, 1999.
16. BARROS, A.C.; LUCATELLI, J.F.; MALUF, S.W. & DE ANDRADE, F.M. "Influência genética sobre a doença de Alzheimer de início tardio". *Rev. Psiqu. Clín.*, **36** (1): 16, 2009.
17. NITRINI, R.; BOTTINO, C.M.; ALBALA, C.; CAPUÑAY, N.S.C.; KETZOIAN, C.; RODRIGUEZ, J.J.L.; MAESTRE, G.E.; RAMOS-CERQUEIRA, A.T. & CARAMELLI, P. "Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts". *International Psychogeriatrics*, **21** (4): 622, 2009.
18. JALBERT, J.J.; DAIELLO, L.A. & LAPANE, K.L. "Dementia of the Alzheimer type". *Epidemiol Rev.*, **30**: 15, 2008.
19. HOLTZMAN, D.M.; MORRIS, J.C. & GOATE, A.M. "Alzheimer's disease: the challenge of the second century". *Sci. Transl. Med.*, **3** (77): 77sr1, 2011.
20. PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Dados sobre o envelhecimento no Brasil. Brasília - DF, 2012. Disponível em: <<http://www.sdh.gov.br/assuntos/pessoa-idosa/dados-estatisticos/DadosobreoenvelhecimentoonoBrasil.pdf>>. Acesso em dez. 2015.
21. ABI. Instituto Alzheimer Brasil. Curitiba - PR, 2015. Disponível em: <<http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br/>>. Acesso em dez. 2015.

22. ANS, Agência Nacional de Saúde Suplementar. "Manual técnico para promoção da saúde e prevenção de riscos e doenças na saúde suplementar prevenção de riscos e doenças na saúde suplementar". 4.Ed rev. e atual. Rio de Janeiro, 2011. 244 p.
23. ABRAZ. Associação Brasileira de Alzheimer - "O que é Alzheimer", 2015. Disponível em: <http://abraz.org.br/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer>. Acesso em: dez. 2015. .
24. SPERLING, R.A.; AISEN, P.S.; BECKETT, L.A.; BENNETT, D.A.; CRAFT, S.; FAGAN, A.M.; IWATSUBO, T.; JACK, C.R., JR.; KAYE, J.; MONTINE, T.J.; PARK, D.C.; REIMAN, E.M.; ROWE, C.C.; SIEMERS, E.; STERN, Y.; YAFFE, K.; CARRILLO, M.C.; THIES, B.; MORRISON-BOGORAD, M.; WAGSTER, M.V. & PHELPS, C.H. "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease". *Alzheimer's & Dementia*, **7**: 280, 2011.
25. ALZHEIMER'S ASSOCIATION. "Cérebro saudável vs. cérebro com Alzheimer", 2015. Disponível em: http://www.alz.org/brain_portuguese/09.asp. Acesso em: dez. 2015.
26. NELSON, P.T.; ALAFUZOFF, I.; BIGIO, E.H.; BOURAS, C.; BRAAK, H.; CAIRNS, N.J.; CASTELLANI, R.J.; CRAIN, B.J.; DAVIES, P.; DEL TREDICI, K.; DUYCKAERTS, C.; FROSCHE, M.P.; HAROUTUNIAN, V.; HOF, P.R.; HULETTE, C.M.; HYMAN, B.T.; IWATSUBO, T.; JELLINGER, K.A.; JICHA, G.A.; KOVARI, E.; KUKULL, W.A.; LEVERENZ, J.B.; LOVE, S.; MACKENZIE, I.R.; MANN, D.M.; MASLIAH, E.; MCKEE, A.C.; MONTINE, T.J.; MORRIS, J.C.; SCHNEIDER, J.A.; SONNEN, J.A.; THAL, D.R.; TROJANOWSKI, J.Q.; TRONCOSO, J.C.; WISNIEWSKI, T.; WOLTJER, R.L. & BEACH, T.G. "Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature". *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **71** (5): 362, 2012.
27. GRANDY, J.K. "Updated guidelines for the diagnosis of Alzheimer disease: A clinical review". *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, **25** (4): p. 50, 2012.
28. QIN, W.; HO, L.; WANG, J.; PESKIND, E. & PASINETTI, G.M. "S100A7, a novel Alzheimer's disease biomarker with non-amyloidogenic alpha-secretase activity acts via selective promotion of ADAM-10". *PLoS one*, **4** (1): e4183, 2009.
29. MANZINE, P.R.; BARHAM, E.J.; VALE, F.A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; PAVARINI, S.C.I. & COMINETTI, M.R. "Platelet a disintegrin and metalloproteinase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease". *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **29** (4): 414, 2014.
30. MANZINE, P.R.; BRAM, J.M.D.F.; BARHAM, E.J.; DO VALE FDE, A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; COMINETTI, M.R. & PAVARINI, S.C.I. "ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: A study with Brazilian elderly". *Dementia and geriatric cognitive disorders*, **35** (1-2): 58, 2013.
31. BAHCALL, O.; NIEMITZ, E. & VOGAN, K. "ADAM10 and Alzheimer's disease". *Nature Genetics*, **45** (11): 1273, 2013.
32. TAKEUCHI, M.; SATO, T.; TAKINO, J.; KOBAYASHI, Y.; FURUNO, S.; KOKUCHI, S. & YAMAGISHI, S. "Diagnostic utility of serum or cerebrospinal fluid levels of toxic advanced glycation end-products (TAGE) in early detection of Alzheimer's disease". *Medical hypotheses*, **69** (6): 1358, 2007.
33. LICHTENTHALER, S.F. "Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential". *Journal of neurochemistry*, **116** (1): 10, 2011.
34. HOOPER, N.M. & TURNER, A.J. "The search for a-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease". *Current Medicinal Chemistry*, **9**: 1107, 2002.
35. EVIN, G.; ZHU, A.; HOLSINGER, R.M.D.; MASTERS, C.L. & LI, Q.X. "Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets". *Journal of Neuroscience Research* **74**: 386, 2003.
36. LAZKA, O.; DEL CAMPO, F.J. & MUÑOZ, F.X. "Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors". *Biosensors & bioelectronics*, **22**: 1205, 2007.
37. LUONG, J.H.; MALE, K.B. & GLENNON, J.D. "Biosensor technology: Technology push versus market pull". *Biotechnology advances*, **26** (5): 492, 2008.
38. RICCARDI, C.S.; DA COSTA, P.I. & YAMANAKA, H. "Imunossensor amperométrico". *Química Nova*, **25** (2): 316, 2002.
39. ROSATTO, S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N. & KUBOTA, L.T. "Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental". *Química Nova*, **24** (1): 77, 2001.
40. ARUGULA, M.A. & SIMONIAN, A. "Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives". *Measurement Science and Technology*, **25** (3): 032001 (22pp), 2014.
41. D'ORAZIO, P. "Biosensors in clinical chemistry". *Clin. Chim. Acta.*, **334** (1-2) 2003.

42. GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J. & OSBORNE, B.A., "Kuby Immunology", (4th ed.). W. H. Freeman and Company, 2000. p. 162. p.
43. RUSLING, J.F.; KUMAR, C.V.; GUTKIND, J.S. & PATEL, V., Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *Analyst*. - 2010. 135, 2496 p.
44. CENTI, S.; LASCHI, S. & MASCINI, M. "Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads". *Talanta*, **73** (2): 394, 2007.
45. LIN, Y.Y.; LIU, G.; WAI, C.M. & LIN, Y. "Magnetic beads-based bioelectrochemical immunoassay of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Electrochemistry Communications*, **9** (7): 1547, 2007.
46. RICCI, F.; ADORNETTO, G. & PALLESCHI, G. "A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors". *Electrochimica Acta*, **84**: 74, 2012.
47. MAO, X.; JIANG, J.; HUANG, Y.; SHEN, G. & YU, R. "Gold nanoparticle accumulation using magnetic particles: A new strategy for electrochemical immunoassay based on the reversible reaction between dethiobiotin and avidin". *Sensors and Actuators B*, **123** (1): 198, 2007.
48. KURAMITZ, H. "Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays". *Analytical and bioanalytical chemistry*, **394** (1): 61, 2009.
49. ESCAMILLA-GOMEZ, V.; HERNANDEZ-SANTOS, D.; GONZALEZ-GARCIA-GARCIA, M.B.; PINGARRON-CARRAZON, J.M. & COSTA-GARCIA, A. "Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor". *Biosensors and Bioelectronics*, **24** (8): 2678, 2009.
50. SERAFIN, V.; EGUILAZ, M.; AGUI, L.; YANEZ-SEDENO, P. & PINGARRON, J.M. "An electrochemical immunosensor for testosterone using gold nanoparticles - carbon nanotubes composite electrodes". *Electroanalysis*, **23** (1): 169, 2010.
51. STOFIK, M.; STRYHAL, Z. & MALY, J. "Dendrimer-encapsulated silver nanoparticles as a novel electrochemical label for sensitive immunosensors". *Biosens Bioelectronics*, **24**: 1918, 2009.
52. MALHOTRA, R.; PATEL, V.; CHIKKAVEERIAIAH, B.V.; MUNGE, B.S.; CHEONG, S.C.; ZAIN, R.B.; ABRAHAM, M.T.; DEY, D.K.; GUTKIND, J.S. & RUSLING, J.F. "Ultrasensitive detection of cancer biomarkers in the clinic by use of a nanostructured microfluidic array". *Anal. Chem.*, **84** (14): 6249, 2012.
53. AFONSO, A.S.; ULIANA, C.V.; MARTUCCI, D.H. & FARIA, R.C. "Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications". *Talanta*, **146**: 381, 2016.
54. NASCIMENTO, V.B. & ANGNES, L. "Eletrodos fabricados por silk-screen". *Química Nova*, **21** (5): 614, 1998.
55. TALEAT, Z.; KHOSHROO, A. & MAZLOUM-ARDAKANI, M. "Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013)". *Microchimica Acta*, **181** (9-10): 865, 2014.
56. FIGUEIREDO, L.C.S.; JANEGTZ, B.C.; FARIA, R.C.; FATIBELLO, O.; MARCOLINO, L.H.; CAETANO, F.R. & DE MATTOS, I.L. "Construção e aplicação de um minissensor de filme de bismuto utilizando materiais de baixo custo para determinações voltamétricas in loco". *Química Nova*, **35** (5): 1016, 2012.
57. GIL, E.S.; KUBOTA, L.T. & YAMAMOTO, Y.I. "Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica". *Química Nova*, **22** (6): 874, 1999.
58. RAMA, E.C.; GONZALEZ-GARCIA, M.B. & COSTA-GARCIA, A. "Competitive electrochemical immunosensor for amyloid-beta 1-42 detection based on gold nanostructured screen-printed carbon electrodes". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **201**: 567, 2014.
59. CHIKKAVEERIAIAH, B.V.; MANI, V.; PATEL, V.; GUTKIND, J.S. & RUSLING, J.F. "Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum". *Biosensors and Bioelectronics*, **26** (11): 4477, 2011.
60. WU, J.; YAN, F.; TANG, J.; ZHAI, C. & JU, H. "A disposable multianalyte electrochemical immunosensor array for automated simultaneous determination of tumor markers". *Clinical chemistry*, **53** (8): 1495, 2007.
61. KRAUSE, C.E.; OTIENO, B.A.; LATUS, A.; FARIA, R.C.; PATEL, V.; GUTKIND, J.S. & RUSLING, J.F. "Rapid microfluidic immunoassays of cancer biomarker proteins using disposable inkjet-printed gold nanoparticle arrays". *Chemistry Open*, **2**: 141, 2013.
62. SONG, W.; LI, H.; LIANG, H.; QIANG, W. & XU, D. "Disposable electrochemical aptasensor array by using in situ DNA hybridization inducing silver nanoparticles aggregate for signal amplification". *Anal. Chem.*, **86**: 2775, 2014.
63. PACHECO, W.F.; SEMAAN, F.S.; ALMEIDA, V.G.K.; RITTA, A.G.S.L. & AUCÉLIO, R.Q. "Voltammetry: A brief review about concepts". *Revista Virtual de Química*, **5** (4): 516, 2013.
64. D., G.J.K., *Cyclic Voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*, VCH, N.Y., Editor. 1993. p. p. 97.
65. BRETT, C. & BRETT, A. "Electrochemistry: Principles, methods, and applications. Coimbra". *Springer*, 1993.

66. OTIENO, B.A.; KRAUSE, C.E.; LATUS, A.; CHIKKAVEERAIHAH, B.V.; FARIA, R.C. & RUSLING, J.F. "On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers". *Biosensors & bioelectronics*, **53**: 268, 2014.